

# **Analyse der Pathogenese der Sarcopenie in PARL-defizienten Mäusen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Claudia Deppe  
aus Krefeld  
2013

Angefertigt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Hartmann
2. Gutachter:

Tag der Mündlichen Prüfung:

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Bonn  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. K. Schilling

**Meinen Eltern**



## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	8
1. Einleitung.....	10
1.1 PARL-Defizienz führt bei jungen Mäusen zu einer letalen Multisystematrophie mit Sarcopenie–artigem Muskelschwund .....	10
1.2 Systematik degenerativer Muskelerkrankungen .....	11
1.2.1 Neurogen bedingte Degenerationsformen.....	11
1.2.2 Myogen bedingte Degenerationsformen.....	12
1.2.3 Sarcopenie .....	15
1.3 Funktion und Dysfunktion von Mitochondrien bei degenerativen Muskelerkrankungen .....	16
1.3.1 Defekte der Atmungskette .....	18
1.3.2 Interaktion von Mitochondrium und sarkoplasmatischem Retikulum und die Regulation des Calciumhaushalts .....	19
1.3.3 Apoptose und Mitochondrien .....	20
1.3.4 Bedeutung der mitochondrialen Dynamik für die Apoptose .....	21
1.4 PARL ist eine mitochondriale Protease der Rhomboid-Familie .....	23
1.4.1 Rhomboide sind Serin-Proteasen mit sechs oder sieben Transmembrandomänen .....	24
1.4.2 Vorkommen und Funktionen von Rhomboid-Proteasen .....	27
1.4.3 Mitochondriale Rhomboide .....	30
1.5 Ist die Sarcopenie (auch) eine Mitopathie? .....	32
2. Fragestellung.....	37
3. Methodisches Vorgehen .....	40

3.1	Tierhaltung und Tierpräparation .....	40
3.2	Eponeinbettung .....	41
3.3	Aufarbeitung für Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	42
3.4	Paraffineinbettung .....	43
3.5	Immunhistochemie an Paraffinschnitten .....	43
3.6	qPCR .....	44
3.7	Western Blot .....	48
3.8	TUNEL-Färbung .....	50
3.9	Aufarbeitung für das Rasterelektronenmikroskop (REM) .....	51
4.	Ergebnisse.....	52
4.1	PARL-Defizienz führt bis zur 12. postnatalen Woche zu einer deutlichen Reduktion der Muskelfaserquerschnittsfläche .....	52
4.2	Immunhistochemisch und ultrastrukturell präsentieren sich Mitochondrien und das assoziierte sarkoplasmatische Retikulum ohne große Auffälligkeiten .....	66
4.3	PARL-defiziente Mäuse zeigen keine deutliche Proteinexpressionsdifferenz des Autophagiemarkers Apg 7 .....	69
4.4	PARL-defiziente Muskulatur gibt keinen Anhalt für das Vorliegen von erhöhter Aktivierung der Apoptose-Signalwege .....	70
4.5	PARL-Defizienz beeinflusst die Proteinexpression von Atmungskettenenzym- komplexen .....	72
4.5.1	PARL-defiziente Muskulatur weist eine verringerte Proteinexpression von SDHA auf .....	72
4.5.2	Die Proteinexpression von ATPB ist in PARL-defizienter Muskulatur verringert..	73
4.6.1	Sirt1 und Ampk zeigen auf Genebene keine Differenzen zwischen Wildtyp- und PARL-defizienter Muskulatur .....	74

4.6.2	In PARL-defizienter Muskulatur ist die Aktivierung von AMPK zu pAMPK transient reduziert.....	75
4.7	Die mtDNA/ nDNA Ratio ist in PARL-defizienter Skelettmuskulatur im Alter von 12 Wochen unverändert .....	76
4.8.1	PARL-defiziente Muskulatur weist eine unveränderte Genexpression von Mitofusin 2 auf .....	77
4.8.2	Die Proteinexpression von Mitofusin 2 zeigt einen biphasischen Verlauf .....	78
4.9	PARL-defiziente Muskulatur zeigt keine Veränderung der SERCA-Genexpression .....	79
5.	Diskussion .....	81
6.	Zusammenfassung .....	99
7.	Anhang.....,.....	101
8.	Literaturverzeichnis .....	109
	Danksagung.....	127
	Lebenslauf .....	128

## Abkürzungsverzeichnis

ADAM	a disintegrin and metalloprotease
AIF	apoptose inducing factor
ANT	Adenine-Nucleotide-Translocase
Bcl 2	B-cell lymphoma 2
BM	Bethlem Myopathy
BMD	Becker Muskel-Dystrophie
Ccp	Cytochrom c Peroxidase
CyP D	Cyclophilin D
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMD	Duchenne Muskeldystrophie
DOA	dominant optic atrophy
Drp1	dynamain related protein
EGF	epidermal growth factor
EndoG	Endonuclease G
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERMES	ER-mitochondria encounter structure
EWGSOP	European Working Group on Sarcopenia in older people
HtrA2	high temperature requirement protein a2
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
M.	Musculus
MAM	mitochondria-associated membrane
MERF	Myoklonus-Epilepsie mit „Ragged Red Fibers“
Mfn2	Mitofusin 2
Mnd2	motor neuron degeneration 2
MOMP	mitochondrial membrane permeabilization
mPTP	mitochondrial permeability transition pore
mtDNA	mitochondriale DNA
nDNA	nuclear DNA
NCAM	neural cell adhesion molecules
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells



KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
OPA1	optic atrophy 1
OXPHOS	oxidative Phosphorylation
PARL	Presenilin-associated Rhomboid-like protease
Pcp1	Prozessierung von Cytochrom c Peroxidase
pink1	PTEN-induced putative kinase 1
PTP	Permeability-Transition-Pore
RHBDL	rhomboid-like Gene
ROS	reactive oxygen species
RRF	red ragged fibers
SDH	Succinat-Dehydrogenase
SERCA	Sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum calcium ATPase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TIM	Proteintranslokase der mitochondrialen Innenmembran
TNF	Tumornekrosefaktor
TOM	Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran
UCMD	Ullrich Congenital Muscular Dystrophy
VDAC	voltage-dependent anion channel

## 1. Einleitung

Die 'Presenilin-associated Rhomboid-like protease' (PARL) ist ein Enzym der inneren Mitochondrienmembran. Es wurde zuerst 1998 bei einem two-hybrid Screen in Hefezellen mit cDNA aus Leber und Gehirn vom Menschen entdeckt, bei dem die C-terminale Region von Presenilin 2 als „bait“ verwendet wurde (Pellegrini et al., 2001). Die ursprüngliche Annahme PARL sei ein Kofaktor von Presenilin 2, eines der katalytischen Zentren der  $\gamma$ -Sekretase (Pellegrini et al., 2001), hat sich zwar inzwischen als Artefakt erwiesen, erklärt aber das ursprünglich erhebliche wissenschaftliche Interesse an PARL.

### 1.1 **PARL-Defizienz führt bei jungen Mäusen zu einer letalen Multisystematrophie mit Sarcopenie-artigem Muskelschwund**

Auch ohne Bezug zum Morbus Alzheimer zeigte eine erste Knockout-Studie an Mäusen (Cipolat et al., 2006), dass PARL eine entscheidende Rolle im Organismus spielt.

Bei PARL-defizienten Mäusen kommt es nach anfänglich normaler Entwicklung ab etwa der 4. Woche zu einer Multisystematrophie, verbunden mit einem Sistieren des Wachstums und mit einem progressiven Gewichtsverlust (Cipolat et al., 2006). Zwischen der 8. und 12. Woche sterben die Mäuse, möglicherweise als Konsequenz aus den Atem- und Bewegungsschwierigkeiten und der generalisierten Kachexie (Cipolat et al., 2006). Der Phänotyp dieser Tiere ist gekennzeichnet durch eine postnatale Atrophie von Milz und Thymus, eine arretierte Maturation der Spermatogenese mit reduzierter Größe von Hoden, Nebenhoden und akzessorischen Drüsen, sowie einem in präpubertärer Morphologie entwickelten Uterus bei histologisch normal entwickelten Ovarien (Cipolat et al., 2006). Auf zellbiologischer Ebene können einige dieser Veränderungen, insbesondere der postnatale Abbau der lymphatischen Gewebe, durch eine pathologisch gesteigerte Apoptose erklärt werden.

Auch die Skelettmuskulatur entwickelt zeitgleich eine deutliche Involution, die nach noch vorläufiger morphologischer Analyse interessante Parallelen zur Sarcopenie, dem alters-assoziierten Muskelabbau des Menschen, aufweist.

Die Sarcopenie wird als Seneszenz-assoziierte Verringerung der Muskelmasse und -leistung definiert (Rosenberg, 1989, 1997). Bei aller Vorsicht gegenüber einer oft uneinheitlich gehandhabten Definition ist anzunehmen, dass bei der Sarcopenie

gegenüber der neurogenen Atrophie und der Muskeldystrophie ein dritter Typ der degenerativen Veränderungen der Muskulatur vorliegt, der sich auf zellulärer Ebene vor allem durch eine signifikante Muskelfaserquerschnittsreduktion und weniger durch einen Verlust von Muskelfasern auszeichnet (McKenzie et al., 2002, s. auch Abschnitt 1.1.3 „Sarcopenie“). Die Sarcopenie führt zu einer erheblichen, sozial-ökonomisch wie medizinisch problematischen Einschränkung der Aktivität älterer Menschen, die durch den demographischen Wandel insbesondere in den Industrienationen zum Tragen kommt. Die genaue Pathogenese dieser Form des Muskelabbaus konnte noch nicht geklärt werden (Marzetti et al., 2010). Vor diesem Hintergrund ist die PARL-defiziente Maus als monogenes Modell für eine Sarcopenie-artige Muskelerkrankung ein hochinteressantes Forschungsobjekt.

## **1.2 Systematik degenerativer Muskelerkrankungen**

Degenerative Muskelerkrankungen können kausal in neurogene Atrophien und myogene, z. T. mitochondrial bedingte Dystrophien gruppiert werden.

### **1.2.1 Neurogen bedingte Degenerationsformen (Lammens et al., 2009)**

Bei Atrophie nach Schädigung eines einzelnen Axons zeigt der Muskel durch die Streuung einer motorischen Einheit ein heterogenes Bild mit gesunden Fasern neben einzelnen atrophischen Fasern, die diffus zwischen den gesunden Fasern verteilt sind. Die neurogen bedingte Degeneration kann entweder auf einer Schädigung des Axons, der Schwann-Zelle, oder des Motorneurons basieren. Erkrankungen, die die Schwann-Zellen betreffen, führen zu einem Verlust des Myelins, was eine segmentale Demyelinisierung bedingt. Die Verletzung eines Nerven führt zu einer Degeneration der Fasern distal zu der Läsion, der Waller'schen Degeneration. Bei einer Axonläsion nahe des Perikaryons kann das ganze Neuron absterben. Liegt die Läsion weiter distal des Perikaryons, kommt es zu charakteristischen lichtmikroskopischen Veränderungen des Perikaryons, der „Chromatolyse“, als Ausdruck einer Hypertrophie, um der benötigten erhöhten Syntheseleistung für die vermehrt auswachsenden Axonsprossen gerecht zu werden. Die Muskelfasern zeigen bei einer neuronal bedingten Schädigung ein typisches Bild mit segmentaler Nekrose, Vakuolen, veränderten Strukturproteinen, einer Anhäufung von intrazytoplasmatischen Ablagerungen, einer Proliferation der

Satellitenzellen als Zeichen der Regeneration und einer Muskelfaserhypertrophie. Für das Vorliegen eines neuronalen Verlustes spricht das von Andersson et al. (1993) entdeckte Auftreten von „neural cell adhesion molecules“ (NCAM) mit zunehmendem Alter. NCAMs werden gebildet als Kompensationsmechanismus bei Verlust eines Alpha-Motorneurons, was zu einer größeren motorischen Einheit führt, die eine unpräzisere motorische Kontrolle hervorruft (Andersson et al., 1993).

Deinnervierte Muskeln können durch ein anderes Motorneuron reinnerviert werden. Dabei kann es zu einer Verschiebung zwischen den Fasertypen 1 und 2 kommen, da die Fasertypen durch das innervierende Motorneuron determiniert werden.

### **1.2.2 Myogen bedingte Degenerationsformen (Manzur et al., 2010)**

Muskeldystrophien zeichnen sich im Gegensatz zu den Atrophien allgemein durch einen progressiven Muskelfaseruntergang mit Fibrosierung des betroffenen Muskels aus. Trotz der differierenden Pathologien weisen sie ein morphologisch ähnliches Bild auf. Dazu gehören eine Muskelfasergrößenvariation, eine erhöhte Anzahl internalisierter Kerne, degenerative, nekrotische und phagozytierte Muskelfasern sowie eine Proliferation endomysialen Bindegewebes und regenerierende Fasern (Neuen-Jacob, 2009). Fibrosierungen und Lipideinlagerungen in die Muskulatur kommen im Spätstadium vor. Häufig liegen auch pathologische Kernzentralisationen, Faser-Splittings oder lobulierte Fasern vor (Neuen-Jacob, 2009). Eine Untergruppe der myogenen Degenerationsformen ist durch eine mitochondriale Dysfunktion bedingt und zeichnet sich durch charakteristische „red ragged fibers“ (RRF), eine Ansammlung von vorwiegend subsarkolemmalen Mitochondrien aus, die sich durch Gomori-Trichrom-Färbung darstellen lassen (Engel et al., 1963). Es zeigen sich typischerweise unimodale Kalibervariationen mit Einzelfaseratrophien und –hypertrophien sowie Muskelfasernekrosen mit Phagozytose.

Typische Ursachen für Muskeldystrophien sind eine defekte Interaktion mit der extrazellulären Matrix wie bei der Duchenne Muskeldystrophie (DMD) oder Becker Dystrophie (BMD), sowie Defekte der mitochondrialen Energiegewinnung (wie z. B. die Myoklonus-Epilepsie mit „Ragged Red Fibers“ (MERF), das Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) und das Leigh Syndrom).

Molekulare Defekte oder das Fehlen von Dystrophin führen zu rezidivierenden lokalen Rissen im Sarkolemm und dadurch zu segmentalen Nekrosen der Muskelfasern, die nach vielen Regenerationsversuchen schließlich untergehen. Die DMD manifestiert sich klinisch bereits in den ersten Lebensjahren mit progredienter, proximal betonter Muskelschwäche und häufig Kardiomyopathien (Manzur et al., 2010). Der Schweregrad ist abhängig von der vorliegenden Mutation (frame-shift Mutation, eine oder mehrere Exonduplikationen im Dystrophingen oder eine Punktmutation mit Aminosäureaustausch). Liegt lediglich eine in-frame Mutation vor, kommt es in 90 % der Fälle zu einer milden Ausprägung der Krankheit, die als Becker Muskeldystrophie bezeichnet wird. Histopathologisch zeichnet sich eine Muskelbiopsie von DMD- und BMD-Patienten durch die oben erwähnten charakteristischen Merkmale einer Muskeldystrophie sowie durch Hyalinfasern aus, die ihre normale Querstreifung verloren haben und im Querschnitt oft vergrößert und abgerundet erscheinen. In späteren Stadien werden die Muskeln schließlich durch Fett und Bindegewebe ersetzt.

Weitere Formen der myogenen Degeneration sind die „Ullrich Congenital Muscular Dystrophy“ (UCMD) und die „Bethlem Myopathy“ (BM), die auf einer Mutation in einem der drei Gene beruhen, die das extrazelluläre Matrixprotein Collagen 6 kodieren. Der genaue Mechanismus, wie ein Defekt/ Verlust von Collagen 6 zur Myopathie führt, ist derzeit noch ungeklärt. 2003 wurde von Irwin et al. eine mögliche mitochondriale Beteiligung bei der Krankheitsentstehung publiziert.

Die Merosin-negative Muskeldystrophie beruht auf einem Defekt einer Untereinheit von Laminin 2, das an der Bildung des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes beteiligt ist, bei dem es Dystrophin über  $\beta$ - und  $\alpha$ -Dystroglycan an die Lamina densa koppelt (Campbell et al., 1989). Die Erkrankung äußert sich in schwerer neonataler Hypotonie, verspätet erreichten „motor milestones“ und Atmungsinsuffizienz. Histologisch präsentiert sich die Merosin-negative Muskeldystrophie wie die Duchenne Erkrankung, allerdings manifestiert sie sich bereits bei Geburt oder in der frühen Kindheit.

Die zweite große Gruppe der myogenen Degenerationen basiert auf mitochondrialen Defekten, z. T. Defekten der mitochondrialen Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung. Letztere werden in der Literatur oft als OXPHOS-Defekte bezeichnet (Lammens et al., 2009). Beispiele mitochondrial ausgelöster Muskeldystrophien sind,

wie zu Beginn des Abschnitts bereits aufgeführt, die MERF, das KSS und das Leigh Syndrom. Die charakteristischen Mitochondrienaggregate finden sich vorwiegend subsarkolemmal, aber auch zwischen den Myofibrillen. Neben den Mitochondrienansammlungen finden sich oft Lipidvakuolen und Glykogen, was zusammen das Bild einer zerrissenen („ragged“) Faser entstehen lässt.

Elektronenmikroskopisch zeigen die Mitochondrien eine irreguläre Form, mit zum Teil parakristallinen Einschlüssen, die hauptsächlich aus mitochondrialer Kreatinkinase bestehen, oder eine veränderte Crista-Struktur (Robbins et al., 2010).

MERF macht sich klinisch durch Myoklonien, Epilepsie, Ataxie, Minderwuchs, Myopathie, Hypakusis und Visusverlust durch Optikusatrophie bemerkbar (Di Donato, 2009). Die Familienanamnese zeigt eine maternale Vererbung. In der Muskelbiopsie findet sich das typische Bild einer mitochondrialen Erkrankung mit RRF. Molekulargenetisch wurde eine Punktmutation in der mtDNA identifiziert, die in den meisten Fällen die tRNA für Lysin betrifft. Das KSS ist eine meist sporadisch vor dem 20. Lebensjahr auftretende Erkrankung. Charakteristisch ist eine progressive Ophthalmoplegie, Retinitis pigmentosa, Kardiomyopathie und Arrhythmie (Di Donato, 2009). Wie auch bei MERF zeigt die Muskelbiopsie RRF (Mita et al., 1989). Der ebenfalls mitochondriale Gendefekt ist nicht so genau bekannt wie bei MERF.

Das Leigh Syndrom wurde zuerst 1951 beschrieben und betrifft vor allem Säuglinge und Kinder. Das klinische Spektrum des genetisch heterogenen Syndroms variiert; neben der bereits in der Kindheit einsetzenden Enzephalomyopathie wird eine erhöhte Tumoranfälligkeit im Erwachsenenalter beschrieben (Rustin et al., 2002). Das Leigh Syndrom kann sich in globalen Entwicklungsverzögerungen, Schluckbeschwerden, Spastiken, Hirnstammdysfunktionen, Dystonien oder abnormen Augenbewegungen äußern. Auslöser können sowohl Mutationen mitochondrialer als auch nukleärer Gene sein, die Komponenten der fünf Komplexe der Atmungskette wie z. B. Succinat-Dehydrogenase A (SDHA) (Komplex II) oder den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex kodieren (DiMauro et al., 1996). Das Unterscheidungsmerkmal zu anderen mitochondrial bedingten Erkrankungen ist das Fehlen der typischen Merkmale einer OXPHOS-Mutante mit RRF (DiMauro et al., 2003).

### 1.2.3 Sarcopenie

Im Gegensatz zu den myogen und neuronal bedingten Muskelerkrankungen ist die Sarcopenie kausal (noch) nicht eindeutig definiert und wird daher in der Literatur oft nur unscharf abgegrenzt und oft nur als eine mit dem Alter einhergehende Verringerung der Muskelmasse definiert (Rosenberg, 1989, 1997). Eine allgemein gültige Definition der Sarcopenie existiert jedoch noch nicht, daher wird es auch als ein Syndrom beschrieben (Inouye et al., 2007).

Die Sarcopenie führt durch den demographischen Wandel mit zunehmender Lebenserwartung ähnlich den Demenzerkrankungen gerade in den entwickelten Ländern zu einem sowohl klinischen wie sozialökonomischen Problem, da die Sarcopenie 5-13 % der 60 bis 70-jährigen und 11-50 % der über 80-jährigen betrifft (Die Daten schwanken abhängig von der den jeweiligen Daten zugrunde liegende Sarcopeniedefinition) (Morley, 2008). Die altersabhängig progredient verlaufende Sarcopenie kann insbesondere jenseits der 7. Lebensdekade zu einer zunehmenden Immobilisierung und damit zu einer zunehmenden Betreuungsbedürftigkeit der Patienten führen (Morley, 2008).

Baumgartner et al. definierten 1998 Sarcopenie als eine Abnahme der Masse der Muskeln in  $(\text{kg})/(\text{m}^2)$  um zwei Standardabweichungen von einer Referenzgruppe, die aus Personen im Alter zwischen 18 und 40 Jahren bestand. Die European Working Group on Sarcopenia in older people (EWGSOP) empfiehlt das gleichzeitige Vorliegen von verringerter Muskelmasse und -funktion oder -stärke als Diagnosekriterien zu nehmen (Cruz-Jentoft et al., 2010). Hintergrund für die Annahme dieser beiden Kriterien ist, dass Muskelstärke nicht allein abhängig von der Muskelmasse ist und kein lineares Verhältnis zwischen Muskelmasse und -stärke besteht (Goodpaster et al., 2006). Neben dieser rein deskriptiven Begriffsdefinition der Sarcopenie werden von einzelnen Autoren auch neuronal bedingte Muskelerkrankungen unter dem Begriff Sarcopenie zusammengefasst, so dass eine an Pathomechanismen orientierte Definition weiter erschwert wird (Brown, 1972; Essen-Gustavsson et al., 1986; Roos et al., 1997).

Auf zellulärer Ebene ist die Sarcopenie charakterisiert durch eine signifikante Muskelfaserquerschnittsflächenreduktion, einen Muskelmassenverlust und –je nach zu Grunde gelegter Definition (vgl. Abschnitt „Sarcopenie“ oben) - einen Faserverlust (McKenzie et al., 2002).

Es werden unterschiedliche ätiologische Faktoren diskutiert: Hormonale Veränderungen (Szulc et al., 2004), geschädigte Satellitenzellen (Lees et al., 2006), erhöhte katabole Zytokinproduktion (wie z. B.  $\text{TNF } \alpha$ ) (Visser et al., 2002), schlechte Ernährung (Dreyer et al., 2005), erhöhte Entzündungsmarker (vor allem IL-6) (Vergunst et al., 2005), erhöhte Konzentration freier Radikale (Ji et al., 1998), erhöhte Apoptose (Dirks et al., 2002; Marzetti et al., 2008a; Marzetti et al., 2008b, Pistilli et al., 2006b), verschlechterte/dysfunktionale Autophagie (Cuervo et al., 2000; Cuervo et al., 2005), mitochondrialer DNA (mtDNA)-Verlust (Hiona et al., 2010) und ein Ungleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Proteolyse (Combaret et al., 2009).

In den letzten Jahren wird zunehmend eine Beteiligung von Mitochondrien an der Pathogenese, nicht nur der Muskeldystrophie, sondern auch der Sarcopenie diskutiert (Safdar et al., 2010). Bei den mitochondrialen Pathomechanismen werden vor allem Atmungskettendysfunktionen wie über eine Fehlfunktion von Komplexen (Wanagat et al., 2001; Hiona et al., 2010), mtDNA-Mutationen (Hiona et al., 2010) und eine Zellschädigung über eine Akkumulation von ROS diskutiert (Leeuwenburgh et al., 2006). Im Gegensatz zu den OXPHOS-Defekten wird bei der Muskeldystrophie u. a. eine erhöhte Belastung durch freie Radikale und/ oder eine pathologische Apoptose einzelner Zellkerne von Muskelfasern angenommen, die dann über eine Nachregulation der Kern-Plasma-Relation (Verlust von Kerndomänen) zu einer Faserschrumpfung führen soll (Midrio, 2006).

### **1.3 Funktion und Dysfunktion von Mitochondrien bei degenerativen Muskelerkrankungen**

Mitochondrien kommen mit variabler Lokalisation in fast allen eukaryontischen Zellen vor (Bereiter-Hahn et al., 1994). Eine besonders systematische Anordnung wird z. B. in einigen Epithelien (basale Streifung) oder in quergestreiften Muskelzellen beobachtet. Zu den Hauptfunktionen der Mitochondrien gehören die Energiegewinnung durch den Citratzyklus und die Atmungskette, die Calciumspeicherung und die Regulation der Apoptose.

Mitochondrien haben keine feste Größe und liegen nicht einzeln, sondern als Netzwerke vor. Im Matrixraum befinden sich eine Vielzahl von Enzymen sowie zwei bis sechs zirkuläre DNA-Moleküle (mtDNA). In menschlichen Zellen ist die mtDNA 16.569



Nukleotide lang und kodiert 37 Gene: 22 tRNAs, 2 rRNAs und 13 Proteine für die Atmungskette. Die rRNA ist wie bei Prokaryonten aus einer 50S Untereinheit und einer 30S Untereinheit aufgebaut. Insgesamt enthalten Mitochondrien etwa 1.000 bis 2.000 verschiedene Proteine, von denen 99 % der Gene nukleär kodiert werden. Die im Kern kodierten Proteine werden als Präproteine mit einer Targeting-Signalsequenz synthetisiert. Die Präproteine gelangen über Proteintranslokasen TOM (Proteintranslokase der mitochondrialen Außenmembran) und TIM (Proteintranslokase der mitochondrialen Innenmembran) ins Mitochondrium (Diaz et al., 2008).

Im Gegensatz zu der inneren Membran ist die äußere Membran für Moleküle mit einem Molekulargewicht von bis zu 5.000 Dalton permeabel. Die äußere Membran enthält zusätzlich Transportproteine, Porine, die reversibel offen oder geschlossen sein können, wie z. B. die „voltage-dependent anion channels“ (VDAC), die als Diffusionspore für hydrophile Moleküle dienen. VDACs haben ein Molekulargewicht zwischen 30 und 36 kDa. Der Durchmesser des Kanals liegt im geschlossenen Zustand bei 1,9 nm und im geöffneten Zustand bei etwa 3 nm (Blachly-Dyson et al., 2001). VDACs werden für den Großteil des Stoffaustausches verantwortlich gemacht; sie sind permeabel für  $\text{Cl}^-$ , ATP, ADP, NADH und NADPH (Rostovtseva et al., 2002). Eine besondere Rolle kommt den VDAC-Kanälen in der Regulation der Apoptose zu, da sie Cytochrom c aus dem Mitochondrium freisetzen. Auch Proteine der B-cell lymphoma 2 (Bcl2)-Familie, wie Bax und Bak interagieren mit VDAC und beeinflussen die Cytochrom c-Freisetzung, wohingegen BH3-Proteine nicht mit VDAC interagieren (Shoshan-Barmatz et al., 2006). Eine weitere wichtige Rolle spielen die VDACs in der Calcium-Homöostase, da sie gemeinsam mit Adenine-Nucleotide-Translocase (ANT) und Cyclophilin D (CyP D) die mitochondriale „Permeability-Transition-Pore“ (PTP) bilden (Crompton et al., 1998). Ein dereguliertes Calciumgleichgewicht führt zur Schwellung der Matrix, was eine Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran hervorruft, die wiederum zur Cytochrom c-Freisetzung führt und das Apoptosegeschehen einleitet (Colombini, 2004).

Die innere Mitochondrienmembran ist Träger der Atmungskette und von Teilen des Citratzyklus und liegt zur Oberflächenvergrößerung entweder in der Form so genannter Cristae, die gefaltet in den Matrixraum ragen, oder in der selteneren Form von Röhren und Tubuli vor, wie z. B. in Zellen der Nebennierenrinde. Der Ansatz der Cristae liegt als „bottleneck“ (Flaschenhals) vor, oft als „cristae junction“ beschrieben (Perkins et al.,

1997). Anpassungen der Fläche der inneren Mitochondrienmembran durch variierende Dichte der Cristae soll mit der oxidativen Phosphorylierungsaktivität korrelieren. Die Regulation der Cristae-Morphologie wird noch diskutiert. Die Anordnung der Cristae wird u. a. durch das Strukturprotein Mitofilin geregelt (John et al., 2005). Eine weitere Besonderheit der inneren Mitochondrienmembran ist das Protein-Phospholipid-Verhältnis von 3:1, das dem von Bakterien entspricht (bei Eukaryonten 1:1), sowie die hohe Konzentration von Cardiolipin. Cardiolipin ist ein Phospholipid, das auch Bestandteil der bakteriellen Plasmamembran ist. Cardiolipin hat vier Fettsäuren, im Gegensatz zu den zwei Fettsäuren bei den Phospholipiden in anderen Zellmembranen. Die zusätzlichen zwei Fettsäuren erhöhen die Impermeabilität für Ionen. Im Gegensatz zur äußeren Mitochondrienmembran enthält die innere Membran keine Porine, was die Diffusion selbst für kleine Moleküle stark einschränkt. Daher benötigen Ionen und Moleküle spezielle Membrantransporter, um in den Matrixraum zu gelangen. Der intermembranöse Spalt weist aufgrund der hohen Permeabilität der äußeren Membran die gleiche Ionen- und Molekülkonzentration wie das Zytosol auf, wohingegen die innere Mitochondrienmembran zum Aufbau eines Membranpotentials führt.

### **1.3.1 Defekte der Atmungskette** (Lammens et al., 2009; Filosto et al., 2007)

Der Proteinanteil der Atmungskette, der durch die Kern DNA kodiert wird, ist achtmal so groß wie der durch die mtDNA. Durch die duale genetische Kontrolle der Mitochondrien können mitochondriale Erkrankungen der Mendelschen Genetik (nukleäre DNA) oder der maternalen Vererbung (mtDNA) folgen (Lammens et al., 2009). Defekte der Atmungskette können bei Erstmanifestation zu einem klinisch sehr heterogenen Erscheinungsbild führen. Der Defekt kann sich entweder nur in einer Dysfunktion einzelner Gewebe oder Organe äußern oder komplexe Multisystemerkrankungen auslösen.

Bei mtDNA Mutationen lässt sich nicht immer eine direkte Genotyp-Phänotyp-Korrelation aufstellen. Erklären lässt sich dieses Phänomen durch die mögliche Heteroplasmie der Mitochondrien. Mitochondrien sind normalerweise homoplasmid: das mitochondriale Genom wird durch eine einzige mtDNA-Spezies vorgegeben (Lammens et al., 2009). Treten Mutationen auf, kann es zu einer Koexistenz von mutierter- und Wildtyp-DNA kommen. Erst bei Unterschreitung einer bestimmten Schwelle an Wildtyp-

DNA treten klinische Symptome auf, wodurch die Variabilität des klinischen Erscheinungsbildes verständlich wird.

Vor allem Gewebe mit hohem ATP-Bedarf wie die Skelettmuskulatur und das zentrale Nervensystem sind von Defekten der Atmungskette betroffen. Das typische lichtmikroskopische Erscheinungsbild sind RRF (s. Abschnitt 1.1.2 „Myogen bedingte Degenerationsformen“).

### **1.3.2 Interaktion von Mitochondrium und sarkoplasmatischem Retikulum und die Regulation des Calciumhaushalts**

Mitochondrien spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation des Calciumhaushalts. Der Ruthenium-Red-sensitive Calcium-Uniporter ist für die Calciumaufnahme verantwortlich und wird über das Membranpotential gesteuert. Die Affinität von Mitochondrien Calcium aufzunehmen, ist jedoch sehr gering (Franzini-Armstrong, 2007), so dass die Calciumaufnahme durch das Mitochondrium nur unter pathologischen Bedingungen mit erhöhter Calciumkonzentration Bedeutung hat. Aus den zunächst kontrovers erscheinenden Befunden, dass Mitochondrien nur eine geringe Affinität für Calcium aufweisen, aber gleichzeitig eine effiziente Calciumaufnahme durch Mitochondrien stattfindet (Miyata et al., 1991; Rizzuto et al., 1992), entstand die „Hotspot Hypothese“: Rizzuto et al. (1992) gehen dabei von einer vorübergehend geformten Mikrodomäne zwischen endoplasmatischem Retikulum (ER) und Mitochondrium mit hoher Calciumkonzentration aus, die entweder auf der gegenüberliegenden Seite des ER oder in der Plasmamembran liegt. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei die auch morphologisch nachweisbare Interaktion zwischen ER und Mitochondrium (de Brito et al., 2009; Rizzuto et al., 1998).

Die relativ stabile Kontaktstelle zwischen Mitochondrium und ER konnte durch subzelluläre Fraktionierung isoliert werden und wurde als „mitochondria-associated membrane“ (MAM) bezeichnet (Vance et al., 1997). Der Transport bzw. Austausch zwischen den beiden Organellen ist nicht energieabhängig, sondern basiert auf einer Komplexbildung aus Proteinen (Mmm 1, Mdm 10, Mdm 12 und Mdm 34), der so genannten „ER-mitochondria encounter structure“ (ERMES) (Kornmann et al., 2009), die ein Reißverschlußsystem bilden (Kornmann et al., 2009). Eine Mutation in einem der ERMES-Komponenten führt zum Zusammenbruch des Komplexes, jedoch variiert der

Phänotyp abhängig von dem zugrundeliegenden mutierten Protein (Kornmann et al., 2009). Defekte von Mdm 12 und Mdm 34 könnten durch ein synthetisches Protein, das ER und Mitochondrium verbindet (ChiMERA), kompensiert werden, nicht jedoch Mutationen von Mmm 1 und Mdm 10.

ERMES bildet spezielle Membranstrukturen, die andere Moleküle rekrutieren, die wiederum physiologische Funktionen der ER-Mitochondrien-Verbindung übernehmen, wie Lipidtransport und Calciumaustausch (Kornmann et al., 2009).

De Brito und Scorrano publizierten 2009, dass Mitofusin 2 (Mfn 2) neben seiner bereits bekannten Funktion für die Mitochondrienfusion (Chen et al., 2003) eine Interaktion zwischen ER und Mitochondrium aufbaut. In Mitofusin-defizienten Zellen lagen nur etwa die Hälfte der ER-Mitochondrien-Komplexe vor, so dass davon ausgegangen werden muss, dass der ER-Mitochondrien-Komplex über diverse Proteine gebildet werden kann. An Mfn 2-defizienten Fibroblasten von embryonalen Mäusen zeigte sich eine 2-fach erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration im ER; Mfn 2 ist somit auch funktionell für den Calciumaustausch zwischen ER und Mitochondrien relevant (Pizzo et al., 2007).

### **1.3.3 Apoptose und Mitochondrien** (Lenaers et al., 2009)

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, beschreibt einen Prozess, bei dem es zur Schrumpfung des Zellkerns mit einer einhergehenden Verdichtung des Chromatins kommt. Das Zytoplasma wird in membranumschlossene Vesikel „verpackt“, die sich dann von der Zelle abschnüren und von phagozytierenden Zellen aufgenommen und ohne Entzündungsreaktion eliminiert werden (in Abgrenzung zur Nekrose). Reguliert wird die Apoptose über interne und externe Stimuli. Der externe Signalweg wird über Ligandenbindung an den TNF/ Fas-Rezeptor gesteuert. Für den intrinsischen Signalweg ist das Mitochondrium die zentrale Regulationsstelle, die über verschiedene Stimuli wie zytotoxischen Stress, DNA-Verlust bzw. -Beschädigung oder Wachstumsfaktorentzug beeinflusst wird.

Im Intermembranraum, speziell in den Cristaebäuchen des Mitochondriums befinden sich die wesentlichen Apoptose regulierenden Proteine wie Cytochrom c und „apoptose inducing factors“ (AIF). Eine entscheidende Rolle für die Freisetzung der proapoptischen mitochondrialen Proteine spielt die Permeabilität der äußeren Membran (mitochondrial membrane permeabilization (MOMP)), die vor allem durch die Bcl-2-

Proteinfamilie reguliert wird. Zur Familie der Bcl-2-Proteine gehören sowohl pro- (wie Bax und Bak) als auch anti- apoptotische (wie Bcl-2 und Bcl-xL) Proteine.

Über den Ablauf der Freisetzung mitochondrialer, Apoptose-regulierender Faktoren gibt es unterschiedliche Modelle. Ein Modell sieht die Bildung einer PTP vor (Kroemer et al., 2007). Durch die Öffnung der PTP kommt es zur Depolarisation, zum Anschwellen der Mitochondrienmatrix und sekundär zur Ruptur der äußeren Membran, was schließlich zur Freisetzung von Apoptose-regulierenden Faktoren führt.

Ein anderes Modell beschreibt die Regulation der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran unabhängig von der PTP, stattdessen über die Aktivierung pro-apoptotischer Proteine (Bak oder Bax) (Wei et al., 2001).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus der Regulation der Apoptose basiert auf der Funktion von „optic atrophy 1“ (OPA1), eines Proteins der inneren Mitochondrienmembran. OPA1 ist eines der am besten charakterisierten Substrate von PARL; abhängig von seiner Proteolyse kann OPA1 die Weite der „crista neck regions“ unterschiedlich einstellen. Frezza et al. (2006) beschrieben dies als entscheidenden Mechanismus für die Beteiligung von OPA1 an der Apoptose. Cytochrom c ist nur teilweise im intermembranösen Spalt lokalisiert, die größte Menge befindet sich in den Cristaluminae. OPA1 stellt man sich als „Korken“ eines „cristae junction“ Flaschenhalses vor (Arnould et al., 2005), wobei eine Überexpression von OPA1 die Cytochrom c-Freisetzung vermindert und anti-apoptotisch wirkt (Cipolat et al., 2006). Auch OPA1-Mutanten können die Öffnung des Cristahalses und damit die Cytochrom c-Freisetzung beeinträchtigen (Yamaguchi et al., 2008).

PARL interagiert mit OPA1 (Cipolat et al., 2006), das seinerseits auch möglicherweise von Metalloproteasen prozessiert werden kann (Guillery et al., 2008). Die Defizienz der Interaktion von PARL und OPA1 mit in der Folge pathologisch weitgestellten Cristahälsen ist eine mögliche Erklärung für die überschießende Apoptose v. a. in lymphatischen Geweben von PARL-defizienten Mäusen.

#### **1.3.4 Bedeutung der mitochondrialen Dynamik für die Apoptose (Sheridan et al., 2010)**

Mitochondrien sind hoch dynamische Organellen aufgrund ständig ablaufender Fusions- und Fissionsprozessen (Chan et al., 2006). Die Fusions- und Fissionsprozesse sind

wichtig für den Protein- und DNA-Austausch, die Reparatur geschädigter Mitochondrien (Chan et al., 2006), deren Verteilung auf die Tochterzellen bei Mitose und Meiose, sowie die Regulation des Mitochondrienabbaus durch Mitophagie. Für den Fissionsprozess ist vor allem das vorwiegend zytosolisch vorliegende „dynamin related protein 1“ (Drp1) verantwortlich, das für die Fission ins Mitochondrium rekrutiert wird (Smirnova et al., 2001). Für die Translokation von Drp1 spielt vor allem der Fis1-Rezeptor der äußeren Mitochondrienmembran eine entscheidende Rolle (James et al., 2003). In Hefen wurden noch zwei weitere Proteine: Mdv 1 und Caf 4 identifiziert, die die Rekrutierung von Drp1 ermöglichen. In Säugetieren konnten noch andere beteiligte Proteine identifiziert werden, wobei die Interaktion der Fissionsproteine und die Bedeutung von Fis1 für Menschen nicht so genau geklärt ist wie in Hefen (James et al., 2003). Für die Fission bildet Drp1 Spiralen an den Fissionsstellen des Mitochondriums, wodurch sich das Mitochondrium zusammenzieht und segmentiert wird (Smirnova et al., 2001).

Wie bei der Fission, sind auch bei der Fusion die innere und die äußere Membran involviert. Eine physiologische Mitochondrienfusion ist für die Zelle essentiell, Fusionsdefekte Zellen zeigen eine verringerte Zellgröße, ein verringertes Membranpotential und eine defekte Atmung (Chen et al., 2005). Das erste Fusionsprotein wurde in *Drosophila* entdeckt: Fuzzy Onion (Fzo), eine große GTPase der äußeren Mitochondrienmembran (Hales et al., 1997). In Hefen ist Mgm1, eine GTPase der inneren Mitochondrienmembran für den Fusionsprozess entscheidend (Okamoto et al., 2005). Mfn 1 und Mfn 2 sind die Paralogen der Mammalia zu Fzo 1 (Santel et al., 2001). Mfn 1 und Mfn 2 sind für die Fusion der äußeren Mitochondrienmembran verantwortlich.

Bei Knockout-Mäusen führt der Verlust von Mfn 1 und Mfn 2 zu einer Mitochondrienfragmentierung (Chen et al., 2003), wobei der Verlust eines der Proteine partiell durch das andere Protein kompensiert werden kann.

Das Homolog zu Mgm 1 in Säugetieren ist OPA1, das für die Fusion der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich ist und die mitochondriale Cristastruktur reguliert (Olichon et al., 2003).

Lediglich in Hefen ist die Regulation von Mgm 1 bekannt. Von Mgm 1 existieren zwei Isoformen, ein Vorläuferprotein und eine reife Form, welche beide für den Fusionsprozess notwendig sind. Nach Import und Schneiden der Zielsequenz wird das

Vorläuferprotein durch die in der inneren Membran gelegene Rhomboid Protease Pep 1 unter ATP-Verbrauch prozessiert.

Während die Fragmentierung der Mitochondrien während der Apoptose als anerkannt gilt, wird die genaue Rolle der Fusions- und Fissionsprozesse dafür kontrovers diskutiert (Sheridan et al., 2010).

Ausschlaggebend für die Apoptose ist eine erhöhte Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran, die zur Freisetzung von Cytochrom c führt.

Es gibt viele Befunde darüber, dass eine Ablation von Drp 1 die Cytochrom c-Freisetzung verringert (Frank et al., 2001; Germain et al., 2005). Gleichzeitig wurde jedoch in zwei Studien gezeigt, dass trotz der partiellen Verhinderung der Cytochrom c-Freisetzung bei Drp 1-Ablation der Zelltod unbeeinflusst bleibt (Estaquier et al., 2007; Parone et al., 2006). Während Proteine aus der anti-apoptotischen Bcl-2 Familie die Zelle vor einem „death stimulus“ schützen können, ist dies durch Modulierung der Fissions- und Fusionsprozesse nicht möglich. Das die Apoptose regulierende Event ist die Bildung einer Bax/ Bak-Pore, die der Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium dient. Da die derzeit vorliegenden Daten keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der Porenbildung durch Veränderungen der Fusions- oder Fissionsprozesse geben, sind Veränderungen der Fissions- und Fusionsprozesse nicht für das Apoptosegeschehen von Bedeutung. Allerdings bleibt anzumerken, dass eine verstärkte Interaktion von BH3-only Proteinen während der Apoptose zu einem Verlust der Mitochondrienfusion führt, so dass vermehrt fragmentierte Mitochondrien entstehen, die in toten Zellen gesehen werden. Zudem gibt es Hinweise, dass durch die Aktivierung der Apoptose die Mitochondrienfusion blockiert wird, so dass die Fragmentierung auf einer Kombination erhöhter Fission und verringerter Fusion basiert (Karbowski et al., 2004).

#### **1.4 PARL ist eine mitochondriale Protease der Rhomboid-Familie**

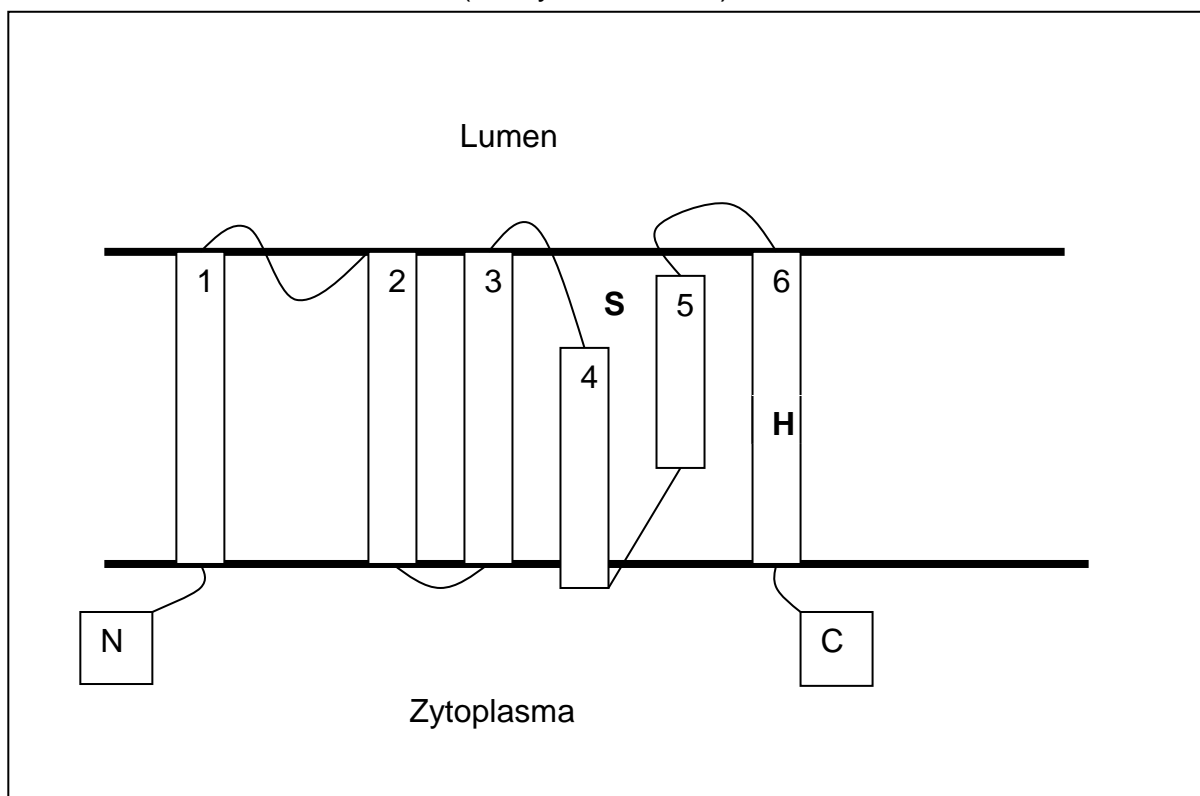
Rhomboide bilden eine Familie von Serinproteasen mit einer Typ 3- Transmembrantopologie, von denen die meisten Ektodomänen von Transmembranproteinen freisetzen, d. h. als Sheddasen agieren. Rhomboid-1 wurde als erster Vertreter dieser Familie als Regulator für die Freisetzung des epidermal growth factors (EGF) in *Drosophila* beschrieben, eines Wachstumsfaktors, dem eine entscheidene Rolle als Signalmolekül für die Induktion der Mitose zugeschrieben wird (Wassermann et al., 1997). Der Name

„Rhomboid“ beruht auf den Rhombus-förmigen Kopf von mutierten Larven (Wassermann et al., 1997).

Rhomboiden sind evolutionär hoch konserviert und bereits bei Prokaryonten nachweisbar. Im Gegensatz zu Bakterien, in denen nur ein Rhomboid-Gen nachgewiesen wurde, kodieren in Hefen 2, in *Drosophila* 7, in Menschen 5 und in *Arabidopsis* 13 Gene für Rhomboiden (Hill et al., 2010).

#### 1.4.1 Rhomboiden sind Serin-Proteasen mit sechs oder sieben Transmembrandomänen

Der einfachste Aufbau von Rhomboiden liegt im Bakterium *E. coli* vor. *E. coli* GlpG hat sechs Transmembrandomänen (Daley et al., 2005).

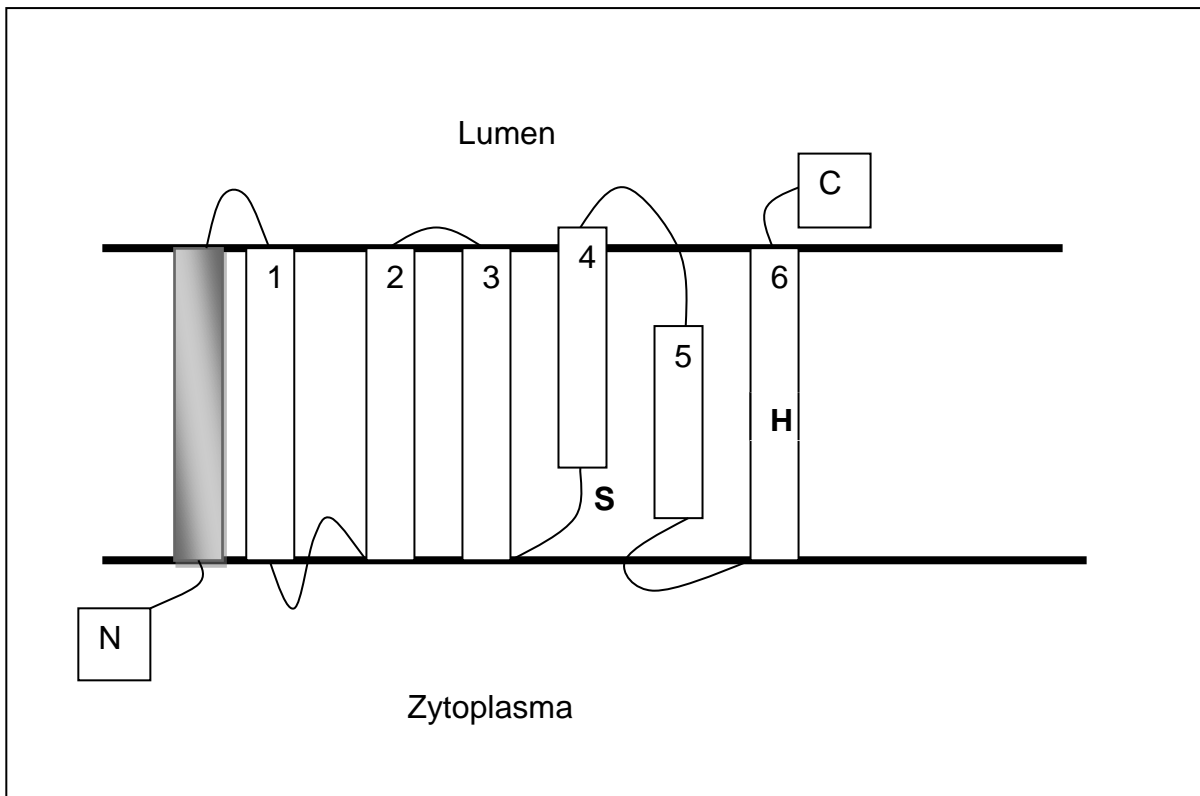


**Abb. 1: Rhomboid Aufbau mit sechs Transmembrandomänen in *E. coli*** (nach Abbildung von Ya Ha im Review 2009)

Sowohl das an der Transmembrandomäne 1 liegende N-terminale Ende als auch das Carboxy-terminale Ende an der Transmembrandomäne 6 zeigen ins Zytoplasma, zudem gibt es ein aktives Zentrum, das aus Serin und Histidin gebildet wird. Durch Mutagenese konnten deren Funktion identifiziert werden (Urban et al., 2002a; Lemberg et al., 2005; Maegawa et al., 2005). Serin fungiert als Katalysator und greift das Substrat nukleophil



an. Histidin ist wechselweise als Säure oder Base für die Protonierung bzw. die Deprotonierung zuständig. In der gefalteten Form der Rhomboide liegen Histidin und Serin nahe nebeneinander und bilden eine Wasserstoffbrückenbindung (Wang et al., 2007). Über die Wasserstoffbrückenbindung wird möglicherweise Histidin dazu befähigt, Serin für einen direkten nukleophilen Angriff des Substrats zu aktivieren. Dieser katalytische Mechanismus, der allerdings noch nicht direkt bestätigt werden konnte, würde mit dem anderer Serin-Proteasen wie Chymotrypsin vergleichbar sein. Der Unterschied zwischen Rhomboiden und anderen Serinproteasen liegt darin, dass letztere meist eine dritte katalytische Komponente haben, die Aminosäure Asparaginsäure (Asp) oder Asparagin (Asn) und damit eine Triade bilden. Rhomboide hingegen bilden eine Dyade.



**Abb. 2: Mitochondriale Rhomboide mit der zusätzlichen (grau ausgefüllten) Transmembrandomäne** (nach Abbildung von Ya Ha im Review 2009)

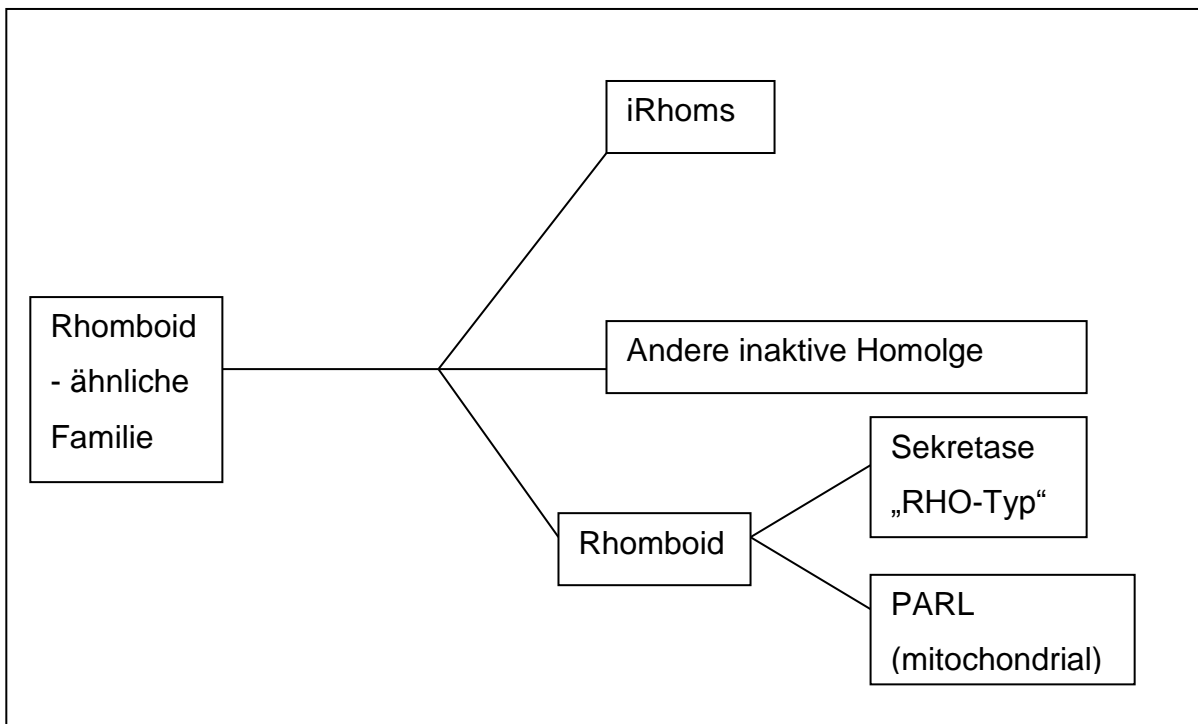
In Eukaryonten liegen Rhomboide mit 7 Transmembrandomänen vor. Eukaryontische Rhomboide werden in zwei Untergruppen unterteilt: Die erste Untergruppe, der RHO-Typ, dessen Prototyp in *Drosophila* vorliegt, weist eine 7. Transmembrandomäne C-terminal auf (6+1); bei der zweiten Untergruppe, die nach ihrem Prototyp PARL

bezeichnet wird, liegt die 7. Transmembrandomäne N-terminal (1+6) (Koonin et al., 2003).

Die zusätzliche 7. Domäne im Vergleich zu den sechs Transmembrandomänen im Bakterium *E. coli* *GlpG* führt beim RHO-Typ dazu, dass das C-terminale Ende zur luminalen Seite der Membran zeigt. Bei den mitochondrialen Rhomboiden liegt die zusätzliche 7. Transmembrandomäne dem Amino-terminalen Ende an, sodass die aktiven Zentren zum Matrixraum zeigen.

Für den Zugang zum aktiven Zentrum bakterieller Rhomboide wurden zwei Hypothesen aufgestellt: Eine Hypothese geht davon aus, dass Teile der Transmembrandomäne des Substrats sich zunächst entfalten und dadurch leichter an das aktive Zentrum gelangen können (Ye et al., 2000; Wang et al., 2007). Die zweite Hypothese besagt, dass die Lipide einen Ring um das Protein (=Substrat) bilden (Vinothkumar, 2011). In der Röntgen Kristallography und der 3D Krystallisation konnte gezeigt werden, dass die Membrenumgebung von *GlpG* aus teils gleichartig angeordneten und teils ungeordneten Lipidmolekülen aufgebaut ist. Die Lipidmoleküle passen sich der Oberfläche des Proteins flexibel an.

Eukaryontische Rhomboide lassen sich neben der strukturellen Einteilung in RHO- und PARL-Rhomboide funktionell in drei Gruppen einteilen: (I) aktive Proteasen, (II) proteolytisch inaktive „iRhoms“, die den Rhomboiden bis auf das Fehlen der aktiven Zentren ähnlich sind, und (III) ebenfalls inaktive Rhomboide, die sich weder zu einer Gruppe zusammenfassen lassen, noch in die Gruppe der iRhoms einzugliedern sind (Hill et al., 2010). Die aktiven Rhomboide lassen sich wiederum in zwei Untergruppen unterteilen: Rhomboide vom „Sekretase-Typ“, wie das in *Drosophila* beschriebene Rhomboid-1 und die Gruppe der mitochondrialen PARL-Rhomboide.



**Abb. 3: Einteilung der Rhomboide** (nach Freeman, 2008)

- **Fruchtfliegen:** In *Drosophila melanogaster* wurden insgesamt 7 Rhomboide beschrieben (Freeman, 2004, 2008); nachträglich benannte man das Rhomboid für die Regulation des EGF-Signalwegs Rhomboid-1. Durch site-directed Mutagenese und klassenspezifische Proteaseinhibitoren konnte von Urban et al. 2001 gezeigt werden, dass in *Drosophila* Rhomboid-1 das EGF-bindende Protein Spitz direkt schneidet. Star, ein weiteres Transmembranprotein, das sowohl im Golgi Apparat als auch im ER lokalisiert ist, ist für die Translokation von Spitz vom ER zum Golgi-Apparat verantwortlich. Durch die Koloalisation von Star und Spitz im ER kann der Star-Spitz-Komplex zum Golgi-Apparat transloziert werden, wo Spitz dann von Rhomboid-1 geschnitten wird und schließlich an EGF bindet (Lee et al., 2001; Pascall et al., 2002; Tsruya et al., 2002). Die Abfolge dieses Vorgangs konnte anhand von pulse-chase Experimenten nachvollzogen werden (Lee et al., 2001).

Trotz ihrer ausgeprägten stammesgeschichtlichen Konservierung ist die Funktion von Rhomboiden, insbesondere ihre Beteiligung an unterschiedlichen Signaltransduktionsprozessen, sehr stark speziesabhängig.

Während Rhomboid-1 in *Drosophila* eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von EGF spielt, haben Rhomboide in anderen Tieren, unter Einschluss von Invertebraten, nur eine sehr geringe oder keine Bedeutung für den EGF-Signalweg. Beispielsweise

entspricht Spitz in *Drosophila* TNF  $\alpha$  in Säugetieren. An der Freisetzung von TNF  $\alpha$  sind allerdings keine Rhomboide beteiligt, sondern einzelne Metalloproteasen der ADAM- (a disintegrin and metalloprotease) Familie (Freeman, 2004).

Wie oben bereits erwähnt, gibt es in *Drosophila* 7 Rhomboid-ähnliche Gene (Guichard et al., 2000; Wassermann et al., 2000). Die dem Rhomboid-1 Gen ähnlichen Gene Rhomboid-2 und Rhomboid-3 sind als Gencluster angeordnet und zeigen Ähnlichkeiten in ihrer biochemischen Funktion, unterscheiden sich aber in ihrem Expressionsmuster (Urban et al., 2002b). Rhomboid-3 ist Rhomboid-1 am ähnlichsten, und es ist bedeutsam für die Entwicklung der Augen (Wassermann et al., 2000) und Tracheen (Gallio et al., 2002b) sowie für die Protektion von epidermalen Zellen vor der Apoptose (Urban et al., 2004). Alle drei Funktionen werden über die Regulation des EGF-Signalwegs vermittelt.

Rhomboid-2 wird in Keimzellen exprimiert und ist für deren Differenzierung verantwortlich (Guichard et al., 2000; Schulz et al., 2002). Über die genaue Funktion von Rhomboid-4 und Rhomboid-6 ist noch nichts bekannt (Urban et al., 2002b). Bei Rhomboid-5 fehlt ein funktionsfähiges katalytisches Zentrum, sodass eine regulatorische Funktion vermutet wird.

Rhomboid-7 ist mitochondrial lokalisiert. Als Substrate konnten HtrA2 (Akronym für Omi) und PTEN- induced putative kinase 1 (PINK1) identifiziert werden (Chao et al., 2008). Genanalysen in *Drosophila* konnten zeigen, dass PINK1 zusammen mit Parkin für die Erhaltung der mitochondrialen Integrität verantwortlich ist, wobei beide die mitochondriale Dynamik beeinflussen (Exner et al., 2007; Poole et al., 2008; Yang et al., 2008). Der Verlust von PINK1 führt zu Mitochondrienaggregaten und geschwollenen Mitochondrien (Yang et al., 2008). Zudem hat PINK1 eine protektive Funktion gegenüber toxischen Insulten in Neuronen (Haque et al., 2008), was Hinweise auf eine zusätzliche, wichtige Funktion von PINK1 außerhalb des Mitochondriums gibt. Bei einer Mutation in PINK1 kommt es zu einer apoptotischen Muskeldegeneration, männlicher Sterilität, mitochondrialen Defekten und dem Verlust der Fähigkeit zu fliegen, was dem Phänotyp einer Rhomboid-7 Mutante entspricht (McQuibban et al., 2006).

Omi ist eine im Kern kodierte Serinprotease, die im Intermembranspalt des Mitochondriums liegt und bei der Apoptose ins Zytosol freigesetzt wird. Es wird

kontrovers diskutiert, ob Omi eine pro- oder anti-apoptotische Funktion hat (Verhagen et al., 2002; Hegde et al., 2002, Chao et al., 2008).

Zudem wird eine Interaktion von PINK1 und Omi diskutiert (Plun- Favreau et al., 2007; Whitworth et al., 2008).

- **Prokaryonten:** Im Bakterium *Providencia stuartii* konnte ebenfalls ein rhomboid-ähnliches Protein charakterisiert werden (Rather et al., 1999; Gallio et al., 2002a). Die frühere Auffassung von Bakterien als frei lebende Zellen wurde durch die Entdeckung des sogenannten „quorum sensing“ revidiert, einer Kommunikation der Bakterien untereinander, die das Verhalten und die Genexpression beeinflusst (Waters et al., 2005). Beim „quorum sensing“ ist die Rhomboid-Protease AarA für die Entstehung des inter-zellulären Signals notwendig (Rather et al., 1999). TatA, das Substrat der Protease AarA (Stevenson et al., 2007), ist Hauptbestandteil einer Proteintranslokase, die fertig gefaltete und modifizierte Proteine über die Membran ins Periplasma transportiert (Lee et al., 2006). TatA weist eine einzelne Transmembrandomäne auf. Mehrere TatA-Proteine lagern sich nach Prozessierung durch AarA zu einem Translokationskanal zusammen (Gohlke et al., 2005; Stevenson et al., 2007).

Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass AarA bei Expression in *Drosophila* den EGF-Signalweg beschleunigen kann. Im Bakterium *Providencia* konnte im Gegenzug gezeigt werden, dass Rhomboid-1 aus *Drosophila* den durch Verlust von AarA entstandenen Phänotyp wettmachen kann (Urban et al., 2002a).

- **Toxoplasmen:** In Parasiten wird Rhomboiden eine mögliche Funktion bei der Invasion in die Wirtszelle zugeschrieben (Dowse et al., 2005). Die Annahme beruht auf der Entdeckung, dass einige Zelladhäsionsproteine von *Toxoplasma gondii* Rhomboidsubstrate sind (Urban et al., 2003).

- **Vertebraten:** In Vertebraten gibt es mindestens sechs rhomboid-like Gene (RHBDLs). RHBDL 1, RHBDL 2 und RHBDL 4 (in einigen Annotationen wird auch RHBDL 3 genannt) können als Proteasen fungieren, wohingegen RHBDL 5 und RHBDL 6 kein aktives Zentrum enthalten (Urban, 2006). Neben den aktiven und inaktiven Rhomboiden besitzen Vertebraten eine mitochondrial gelegene Rhomboid-Protease, PARL (Erläuterungen zu PARL s. u. 1.3.3 „Mitochondriale Rhomboide“).

Als Substrate für RHBDL 2 dienen B-Typ Ephrine (Pascall et al., 2004) und Thrombomodulin, das in Endothelzellen eine Schlüsselrolle in der Hemmung der Blut-

gerinnung spielt (Lohi et al., 2004). Ephrine sind membranständige Signalproteine, die über die Bindung an Tyrosin-Kinase-Rezeptoren ihre Funktion bei der Gehirnentwicklung entfalten. Man nimmt an, dass B-Type Ephrine an die Membran angelagert sein müssen, um Signale senden oder empfangen zu können. Daher wird die Aktivität von B-Typ Ephrinen durch das Schneiden von RHBDL 2 terminiert.

RHBDL 4 oder Ventrhoid wird vor allem im Rückenmark exprimiert (Jaszai et al., 2002). Jedoch steht die Identifizierung möglicher Substrate noch aus.

Dem nicht-katalytischen RHBDL 5 wird eine Funktion im EGFR-Signalweg zugeschrieben (Nakagawa et al., 2005), dessen Mechanismus ebenfalls noch ungeklärt ist.

In Mäusen sind zwei Rhomboide mit ihren jeweiligen Substraten identifiziert. RHBDL 2, dessen Substrat Thrombomodulin ist, und das mitochondrial gelegene Rhomboid PARL, welches Rhomboid 7 in *Drosophila* entspricht (McQuibban et al., 2006). Substrate von PARL sind optic atrophy 1 (OPA1), HtrA2/Omi und PINK1. OPA1 und HtrA2/Omi haben beide eine Funktion in der Apoptoseregulation (s. Abschnitt 1.2.4 „Apoptose und Mitochondrien“ (für OPA1) und 1.3.3 „Mitochondriale Rhomboide“ (für Omi)).

PINK1 ist nicht wie in *Drosophila* an Fusion- und Fissionsprozessen beteiligt, sondern bietet eine Schutzfunktion gegenüber oxidativem Stress (Mei et al., 2009) (s. Abschnitt 1.3.3 „Mitochondriale Rhomboide“).

### 1.4.3 Mitochondriale Rhomboide

Mitochondriale Rhomboide wurden erstmals 2002 in Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) beschrieben (Esser et al., 2002). Dort ist Pcp1 („Prozessierung von Cytochrom c Peroxidase“) für die Prozessierung von Ccp1 (Cytochrom c Peroxidase) (Esser et al., 2002) und Mgm1 (McQuibban et al., 2003; Herlan et al., 2003) an der inneren Mitochondrienmembran verantwortlich. Mgm1 wurde bereits im obigen Abschnitt bei den Fissionsprozessen als eine für die Mitochondrienmembranfusion verantwortliche GTPase erläutert. Mgm1 wird als Transmembranprotein synthetisiert. Zur Aktivierung wird eine kleine Menge von Mgm1 über die Freisetzung durch Pcp1/ Rbd1 in den Intermembranspalt freigesetzt. Bei der Ablation des Pcp1 Gens in Hefezellen zeigten mehr als 3/4 der Pcp1 Knockouts teilweise fragmentierte Mitochondrien, von denen knapp 2/5 der Mitochondrien sogar komplett fragmentiert waren. Pcp1-Knockouts zeigen ein

ähnliches Bild wie Hefezellen, in denen Proteine fehlen, die für die mitochondriale Fusion verantwortlich sind, wie Fzo1 und Mgm1.

Ccp spielt als Substrat von Pcp1 nur eine untergeordnete Rolle. Ccp wird zunächst durch eine andere in der inneren Mitochondrienmembran gelegene mAAA Protease und erst im 2. Schritt von Pcp 1 geschnitten, das schließlich zur Freisetzung in den intramembranösen Spalt führt. Allerdings kann der alleinige Verlust von Ccp durch Mgm1 ausgeglichen werden (Herlan et al., 2003). In *Drosophila* regulieren ebenfalls mitochondrial gelegene Rhomboide die Mitochondrienfusion (McQuibban et al., 2003). Ob dafür aber allein OPA1, das Homolog zu Mgm 1, verantwortlich ist, bleibt ungeklärt. In HeLa Zellen von *Drosophila* konnte PINK1 als ein Substrat von Rhomboid-7 identifiziert werden, das an den Fissions-/ Fusionsprozessen beteiligt ist (Yang et al., 2008). Der Verlust von PINK1 führt zu Mitochondrienaggregaten und geschwollenen Mitochondrien (Yang et al., 2008).

In Säugetieren konnte bislang keine Funktion der mitochondrialen Rhomboide in der direkten Membranfusion nachgewiesen werden. Mitochondriale Rhomboide sind stattdessen am „Cristae junctional sealing“ (der Engstellung der Cristahälse) über OPA1 beteiligt und spielen über die Freisetzung von Cytochrom c und anderer proapoptotischer Faktoren eine Rolle in der Apoptoseregulation (s. o. 1.2.4 „Apoptose und Mitochondrien“). Neben der Funktion in der Apoptose konnte bei einer Untergruppe von Patienten mit „dominant optic atrophy“ (DOA), die durch eine selektive Degeneration von retinalen Ganglienzellen charakterisiert ist, eine inaktivierende Mutation im für OPA1 kodierenden Gen detektiert werden. Neuerdings wird als möglicher Pathomechanismus für die Entstehung der DOA eine Interaktion von OPA1 mit Komplexen der Atmungskette und AIF diskutiert (Zanna et al., 2008). Inwieweit OPA1 die Kopienanzahl an mtDNA beeinflusst, wird kontrovers diskutiert: Sowohl eine Verringerung (Kim et al., 2005) als auch eine Erhöhung (Zanna et al., 2008) der mtDNA-Kopien in Zellen (Kim et al.: Leukozytenzellen, Zanna et al.: Haut-Fibroblastenzellen) von Patienten mit DOA mit einer Mutation im für OPA1 kodierenden Gen wurde beschrieben.

Eine weitere Funktion in der Apoptoseregulation kommt mitochondrialen Rhomboiden über die Prozessierung von HtrA2/ Omi zu. In *Drosophila* interagieren Omi und Rhomboid-7 direkt, wohingegen in Mäusen die Interaktion zwischen PARL und Omi nur indirekt stattfindet. Chao et al. (2008) publizierten ein Modell der Apoptoseregulation,

das eine Interaktion zwischen Hax1 und PARL und eine Regulation von Bax über Omi vorsieht. Hax1-Knockout Mäuse zeigen ein ähnliches phänotypisches Bild wie Mäuse mit einer HtrA2 Mutation. Hax1 führt zu einer erhöhten Apoptose von Neutrophilen und einem Verlust von Lymphozyten mit zunehmendem Alter in der Milz (Chao et al., 2008). Eine weitere Funktion von Omi konnte durch eine Punktmutation im kodierenden Gen für Omi identifiziert werden. Letztere führt zum Verlust der Serinprotease Aktivität in „motor neuron degeneration 2“ (mnd2) Mäusen, was sich in Muskelverlust und striataler Neurodegeneration äußert (Jones et al., 2003).

Neben der Apoptoseregulation kommt mitochondrialen Rhomboiden in Säugetieren über die Regulation von PINK1 eine Schutzfunktion gegenüber oxidativem Stress (Deas et al., 2011) sowie eine Funktion in der Eliminierung von defekten Mitochondrien durch Mitophagie zu (Narendra et al., 2009; Geisler et al., 2010). Mutationen in der Kinasedomäne und dem C-Terminus von PINK1 führen zu einer herabgesetzten Kinase Aktivität, die als ursächlich für die autosomal-rezessiv vererbte „early onset Parkinson disease 6“ diskutiert wird (Valente et al., 2004). PARL-Defizienz führt dazu, dass PINK1 von einer bisher unbekannten zweiten Protease geschnitten wird, wobei andere Proteinfragmente entstehen, die unter physiologischen Bedingungen nicht entstehen. Bei der Sequenzanalyse von 82 an Parkinson erkrankten Patienten konnte keine Mutation in der kodierenden Region von PARL detektiert werden. Es lässt sich somit kein direkter Zusammenhang zwischen PARL und der nach Mendel vererbten Form der Parkinson Erkrankung knüpfen (Deas et al., 2011). Daher geht man davon aus, dass das Präprotein eine nur geringe Kinaseaktivität hat, die geschnittene Form von PINK1 hingegen die funktionell aktive Form ist, die die Zelle vor oxidativem Stress schützt (Deas et al., 2011).

## **1.5 Ist die Sarcopenie (auch) eine Mitopathie?**

Wie eingangs erwähnt, wird eine mitochondriale Beteiligung an der Sarcopenie-entstehung diskutiert, z. B. im Zusammenhang mit einer Reduktion des Mitochondriengehalts pro Muskelfaser (Marzetti et al., 2010).

Der mit dem Alter abnehmende DNA-Gehalt der Mitochondrien und die verringerte Proteinsynthese, die eine reduzierte Kapazität für die oxidative Phosphorylierung



bedingt, werden ebenfalls als Faktoren bei der Krankheitspathogenese diskutiert (Welle et al., 2003; Rooyackers et al., 1996).

Die Freisetzung von Calcium aus dem SR in das Zytoplasma ist ein entscheidender Mechanismus, der die Muskelkontraktion induziert. Dabei wird Calcium über den Ryanodin-Rezeptor im SR freigesetzt und über Calcium-ATPasen auch wieder zurückgepumpt, wodurch der Muskel letztlich relaxiert. Sowohl der Ryanodin-Rezeptor als auch die Calcium-ATPasen sind im höheren Alter verändert (Ferrington et al., 1998), was zu einer verlängerten Kontraktionszeit als auch zu einer verlängerten Relaxationszeit beiträgt und einen Mechanismus für die Sarcopenieentstehung bietet. Für die Calciumhomöostase oder den -austausch ist zudem die ER-Mitochondrien-Verbindung bedeutsam (Kornmann et al., 2009). Der Verlust einer mitochondrialen Protease könnte daher eine dysfunktionale Interaktion bedingen und über einen fehlregulierten Calciumspiegel zur Sarcopenie führen.

Mazetti et al. (2008a) beschrieben als möglichen Pathomechanismus der Sarcopenie eine erhöhte Aktivierung des Apoptose-Signalwegs in der Skelettmuskulatur älterer Individuen. Im Kontrast zu anderen Zelltypen wird bei Skelettmuskelfasern statt eines direkten Zelluntergangs nur der Verlust einzelner Kerne und Kerndomänen (Bereiche in einer Faser, die jeweils von einem der Kerne mit mRNA versorgt werden) angenommen. Da für Muskelfasern die Existenz von Kerndomänen nachgewiesen wurde, könnte deren Abbau nach Kernverlust eine sukzessive Schrumpfung der Faser erklären (Hall et al., 1989).

Interessanterweise wurde eine altersabhängige und muskeltypenspezifische Bax und Bcl-2 Expression festgestellt (Rice et al., 2006): Bax war im „fast-twitch“ (Typ 2 Faser) M. extensor digitorum longus in alten Ratten erhöht, wohingegen keine Veränderung im „slow-twitch“ (Typ 1 Faser) M. soleus vorlag. Beide Muskeln zeigten hingegen eine erhöhte Bcl-2 Expression, was als Kompensationsmechanismus zur Begrenzung des Muskelzellkernverlustes interpretiert werden kann. Andererseits wurde in alten Mäusen eine erhöhte Serin-Phosphorylase Aktivität festgestellt, die zu einer Bcl-2 Inaktivierung führte (Braga et al., 2008); damit wird die diskutierte Funktion von Bcl-2 als anti-apoptotischer Faktor zu fungieren trotz der erhöhten Expression aufgehoben (Rajah et al., 2002).

Neben einer veränderten Expression der Bcl-2 Proteinfamilie konnte eine erhöhte Empfindlichkeit für die Öffnung der „mitochondrial permeability transition pore“ (mPTP) in gealterten Skelettmuskelzellen gezeigt werden (Tamilselvan et al., 2007; Chabi et al., 2008; Seo et al., 2008). Als mögliche drei Komponenten der mPTP werden VDAC, Adenine-Nucleotide-Translocase (ANT) und Cyclophilin D (CyP D) diskutiert (Kroemer et al., 2007) (s. obigen Abschnitt 1.2.4 „Apoptose und Mitochondrien“).

Interessanterweise wurde eine erhöhte Expression von CyP D im Vergleich zu ANT und VDAC im M. gastrocnemicus von alten Ratten festgestellt (Marzetti et al., 2008a), was auf eine erhöhte Empfindlichkeit für das Öffnen der mPTP bei Älteren schließen lässt.

Ob Cytochrom c, das über eine Caspasen-Kaskade zur Apoptose führt, die Sarcopenieentstehung triggert oder sogar bedingt, bleibt fraglich. Die Datenlage dazu ist widersprüchlich, so gibt es Veröffentlichungen, die sich für eine erhöhte zytosolische Cytochrom c Konzentration in Muskelzellen von alten Ratten aussprechen (Siu et al., 2006) und andere wiederum publizieren keine erhöhte Konzentration von Cytochrom c in alten Ratten festgestellt zu haben (Dirks et al., 2002; Dirks et al., 2004; Marzetti et al., 2008b; Pistilli et al., 2006b).

Einige andere Studien zeigten eine Aktivierung Caspase-unabhängiger Apoptose-Signalwege mit fortschreitendem Alter, wie z. B. AIF und Endonuclease G (EndoG) (Dirks et al., 2002; Marzetti et al., 2008b; Baker et al., 2006; Leeuwenburgh et al., 2005). AIF und EndoG sind beides Mediatoren, die nach der Freisetzung aus dem Mitochondrium in den Kern wandern und dort zu einer Caspase-unabhängigen DNA-Fragmentierung führen. Es zeigte sich eine altersabhängige sowohl zytosolisch als auch nukleär erhöhte Expression von AIF und EndoG im Gastrocnemicusmuskel in Ratten (Marzetti et al., 2008b). Zudem zeigte sich eine mit fortschreitendem Alter erhöhte Genexpression von AIF im Plantarismuskel von Ratten, wobei eine Korrelation zwischen der Genexpression und dem Fortschreiten der Sarcopenie feststellbar war (Baker et al., 2006).

Neben der über mitochondriale Proteinfreisetzung gesteuerten Apoptose wird vor allem der über den „death-receptor“ ausgelöste Signalweg als möglicher Auslöser des altersbedingten Muskelmassenverlusts diskutiert (Phillips et al., 2005; Pistilli et al., 2006a; Marzetti et al., 2008b; Marzetti et al., 2009). Interessanterweise ist die Transduktion von Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$ , der den „death-receptor“ Signalweg

triggert, Fasertyp-spezifisch (Phillips et al., 2005): In Ratten zeigte der M. vastus lateralis (vor allem Typ 2 Fasern) eine erhöhte Aktivität des über TNF  $\alpha$  regulierten Apoptose-Signalwegs, wohingegen der M. soleus (vor allem Typ 1 Fasern) eine erhöhte Aktivität des „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“ (NF- $\kappa$ B) Signalwegs zeigte. NF- $\kappa$ B kann die Expression anti-apoptotischer Gene fördern. Diese Beobachtung bietet einen möglichen Erklärungsansatz für den mit fortschreitendem Alter vorliegenden Muskelmassenabbau, der verstärkt Typ 2 „fast- twitch“ Fasern betrifft (Lexell et al., 1995). Gestützt wird diese Annahme auch von Marzettis gemachter Beobachtung, dass im M. extensor digitorum longus (Typ 2 Fasern) der Ratte eine altersabhängig zunehmende Apoptose stattfindet, wohingegen im M. soleus auch mit fortschreitendem Alter keine DNA-Fragmentierung nachweisbar ist (Marzetti et al., 2008b). Interessanterweise konnte der altersabhängige Anstieg an DNA-Fragmentierung und von TNF  $\alpha$  durch 4-wöchiges Training in einer Tretmühle rückgängig gemacht werden.

Für den TNF  $\alpha$ -Signalweg wurden zwei mögliche beeinflussende Faktoren gefunden: Interleukin (IL) 15, ein anti-apoptotisch und anabol wirkendes Interleukin, und insulin-like growth factor-1 (IGF-1), ein potentester Stimulator für Muskelaufbau, -hypertrophie und -stabilität. Sowohl für IL-15 als auch für IGF-1 konnte gezeigt werden, dass sie zu einer verringerten Aktivierung des über TNF  $\alpha$  induzierten Apoptosewegs führen (Marzetti et al., 2009; Saini et al., 2008).

Auch wenn für den altersabhängigen Muskelabbau an Tiermodellen die Apoptose eine Schlüsselrolle zu spielen scheint, ist dieser Weg beim Menschen nicht belegt. Es gibt bisher nur drei Veröffentlichungen, die über das Auftreten von Muskelzellapoptose bei älteren Menschen berichten (Strasser et al., 1999; Whitman et al., 2005; Malmgren et al., 2001). Whitman et al. (2005) fanden bei ihren Untersuchungen heraus, dass die mit steigendem Alter zunehmende Muskelzellapoptose nicht mit veränderter Caspase-3 oder Caspase-7 Aktivität einhergeht. Park et al. (2010) fanden beim M. semitendinosus von mittel-altrigen Männern eine erhöhte Expression von AIF, jedoch auch keine veränderten Caspase-3 Spiegel. Beide Befunde stützen die von Marzetti et al. (2008a) geäußerte Vermutung, dass dem altersbedingten Muskelzellabbau ein Caspase-unabhängiger Apoptoseweg zugrunde liegt.

Derzeit wird Sarcopenie Patienten vor allem physikalische Therapie angeraten. Bewegung soll zu einer erhöhten Proteinsynthese und Muskelhypertrophie führen, die die Muskelstärke altersunabhängig erhöht (Kosek et al., 2006; Hasten et al., 2000). Zusätzlich werden pharmakologische Therapien diskutiert wie die Gabe von Testosteron, Wachstumshormonen oder Dehydroepiandrosteron.

PARL ist insofern ein hoch interessantes Modell, als dass hier ein Sarcopenie-artiger Verlust von Muskelmasse erstmals an einem spezifischen Gen bzw. einem mitochondrialen Protein festgemacht werden kann.

## 2. Fragestellung

Die Sarcopenie ist eine Seneszenz-assoziierte spezifische Form des Muskelabbaus, deren kausale Pathogenese bislang nur sehr unvollständig verstanden ist. Die Inzidenz und der potentiell erhebliche Schweregrad sind streng an das Lebensalter gekoppelt. Damit ist die weitere Erforschung dieses Krankheitsbildes gerade für Industrienationen mit ihrem typischen demographischen Wandel von erheblicher medizinischer und sozioökonomischer Bedeutung. Tiermodelle, die auf der Basis bekannter monogener Defekte ein solches Krankheitsbild nachstellen, sind daher von besonderem wissenschaftlichem Interesse.

Die mitochondriale Rhomboid-Protease PARL spielt über die Prozessierung von OPA1 eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Weite der „Cristahälse“ in Mitochondrien (Cipolat et al., 2006). Bei der von Cipolat et al. 2006 beschriebenen PARL-Knockout Maus zeigten die Cristahälse eine pathologische Erweiterung mit einem erleichterten Zutritt von pro-apoptotischen Proteinen wie Cytochrom c zu Intermembranraum und Zytoplasma. Weitere Substrate von PARL wie HtrA2/Omi spielen ebenfalls eine Rolle in der Kontrolle der Apoptose oder werden wie PINK1 und Parkin als Teile eines mitochondrialen Qualitätskontrollsystems betrachtet (Exner et al., 2007; Poole et al., 2008; Yang et al., 2008). Die PARL-defiziente Maus zeigt einen Phänotyp, der ähnlich wie bei HtrA2/Omi durch eine pathologisch gesteigerte Apoptose vor allem in den lymphatischen Organen dominiert wird. Demgegenüber gibt es noch keine schlüssige Erklärung für die ebenfalls beschriebene Sarcopenie, die sich durch eine Kaliberabnahme der einzelnen Muskelfasern ohne offensichtliche Zellzerstörung oder Zeichen einer neurogenen Atrophie auszeichnet. Cipolat et al. (2006) vermuten den apoptotischen Verlust von Kerndomänen mit nachfolgender Faserschrumpfung durch Nachregulation der Kern-Plasma-Relation als mögliche Erklärung; dieses Konzept ist bislang jedoch noch nicht experimentell untermauert.

Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit an der PARL-Knockout Maus folgende Aspekte des Muskelphänotyps untersucht:

- Um die Kinetik der Entstehung der Kaliberdifferenz, ihre Verteilung und mögliche lichtmikroskopisch sichtbare Muskelveränderungen erfassen zu können, wurden die Muskelfaserquerschnittsflächen anhand von lichtmikroskopischen Schnitten

an mehreren Muskeln im zeitlichen Verlauf quantifiziert. Gleichzeitig wurden durch transmissionselektronische Darstellung und intrazelluläre Raster-elektronenmikroskopie nach Osmiummazeration ultrastrukturelle Veränderungen der Skelettmuskulatur analysiert.

- Die Verteilung der Mitochondrien in Skelettmuskelzellen von PARL Wildtyp- und Knockout-Mäusen wurde sowohl lichtmikroskopisch (konfokale Aufnahmen nach immunhistochemischer Darstellung der Mitochondrien mit Antikörpern gegen Muf 1 und Aconitase 2) als auch transmissionselektronenmikroskopisch erfasst.
- Autophagie beschreibt einen Prozess, der zur Degradierung von Zellbestandteilen führt und als ein Pathomechanismus für die Sarcopenie beschrieben wird (Wohlgemuth et al., 2010). Gleichzeitig sind zwei Substrate von PARL, PINK1 und Parkin, für die Erhaltung der mitochondrialen Integrität verantwortlich, u. a. durch Regulation der Mitophagie (Exner et al., 2007; Poole et al., 2008; Yang et al., 2008); daher wäre beim Ausfall deren Prozessierung durch PARL eine Störung des mitochondrialen Abbaus denkbar. Ob der Sarcopenie der PARL-Knockout Maus eine Autophagie zugrunde liegt, wurde anhand von Apg 7, einem Autophagiemarker, der insbesondere in der Skelettmuskulatur eine Rolle spielt, untersucht. Gleichzeitig wurden die Muskeln transmissionselektronenmikroskopisch auf ultrastrukturelle Auffälligkeiten untersucht, wobei u. a. auf Autophagie-Vakuolen geachtet wurde.
- Eine der Schlüsselrollen von PARL ist die Prozessierung von OPA1, wodurch pro-apoptotische Faktoren leichter ins Zytosol freigesetzt werden können. Als ein möglicher Pathomechanismus der Sarcopenie wird der apoptotische Kernverlust von Muskelfasern diskutiert (Marzetti et al., 2008a), der auch eine mögliche Erklärung für die Muskelpathologie der PARL-Knockout Maus geben könnte. Anhand des TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling) assays an Muskelproben sollte daher untersucht werden, ob (unabhängig vom Mechanismus der Aktivierung) die Endphase der Apoptose bei PARL-defizienten Mäusen vermehrt aktiviert ist. Zusätzlich wurde das Vorliegen einer erhöhten Aktivierung des Apoptose-Signalwegs auf Proteinebene anhand des Proteins VDAC untersucht, das an der Bildung eines Kanals für die Cytochrom c Freisetzung beteiligt ist. VDACs sind Proteine der äußeren Mitochondrien-

membranen und bilden Porin-Kanäle, die als Diffusionspore für hydrophile Moleküle dienen (Kroemer et al., 2007).

- Da PARL eine Protease der inneren Mitochondrienmembran ist, könnte eine PARL-Defizienz einen Einfluss auf die mitochondriale Atmungskette haben. Die Expression der Leitproteine von Komplex II (SDHA) und der ATP-Synthase B, die beide mitochondrial kodiert sind, wurden im quantitativen Western Blot untersucht. SDHA ist Teil des mitochondrial gelegenen Komplex II, der Succinate-Ubiquinol-Oxidoreduktase, der Atmungskette. ATPB bildet die  $\beta$ -Untereinheit des F1-Komplexes der ATP-Synthase und ist somit ebenfalls ein Teil der Atmungskette. Die Identifizierung und Lokalisation von ATPB wurde immunhistochemisch untersucht.
- Ein „typischer“ Atmungsketten („OXPHOS“)-Defekt resultiert in einem Energiedefizit. Ein möglicher Einfluss auf den ATP-Spiegel wurde durch Messung der Expression zweier „Energiesensoren“ mittels qPCR untersucht, 5-prime-Amp-activated protein kinase (Ampk) und Sirt1. Zusätzlich wurde die Aktivierung von AMPK zu phospho-Ampk zwischen Wildtyp und Knockout verglichen, da ein Energiedefizit durch eine Hochregulation von p-Ampk kompensiert werden kann.
- Mutationen oder (partieller) Verlust von mtDNA (Heteroplasmie) werden als möglicher Auslöser einer Sarcopenie diskutiert (Hiona et al., 2010). Derartige Defekte können auch indirekt durch erhöhte ROS-Belastung nach Reduktion der Aktivität von Komplex II / SDHA (Ernster et al., 1995) (Buck et al., 1996) wie z. B. beim Leigh Syndrom (Bourgeron et al., 1995) auftreten. Daher wurde die mtDNA/nDNA Ratio zwischen Wildtyp- und PARL-defizienten Mäusen mittels qPCR in einer Zeitserie verglichen.
- Eine fehlregulierte Calciumpufferung zwischen Mitochondrium und SR aufgrund von Ryanodin-Rezeptor- oder Calcium-ATPasen-Defekten (Ferrington et al., 1998) wird als ein möglicher Auslöser für Muskelschäden diskutiert. Auf molekularer Ebene sollte durch quantitative PCR die Expression der beteiligten Proteine (Mfn 2, Sarcoplasmic/ endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 (SERCA 1) und SERCA 2) untersucht werden. Gleichzeitig wurde die Proteinexpression von Mitofusin 2 quantitativ mittels Western blot untersucht. Um

zusätzlich eine Aussage über die Lokalisation zu erhalten, wurde Mitofusin 2 immunhistochemisch untersucht.

Zusätzlich bietet die Analyse der SERCAs eine erste Aussage über Änderungen des Fasertypprofils der Muskeln während der Sarcopenie, da das SERCA 1 Gen ausschließlich in Typ 2 (fast-twitch) Fasern exprimiert wird, wohingegen SERCA 2 ausschließlich in Typ 1 (slow-twitch) Fasern vorkommt.

### **3. Methodisches Vorgehen**

#### **3.1 Tierhaltung und Tierpräparation**

Die Mäuse wurden unter konventionellen Bedingungen mit einem 12/12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten; für die Zucht wurde ein Paarungszeitpunkt um Mitternacht angenommen. Der Geburtstermin wurde als Tag 0,5 angesehen. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.

Die Tötung einzelner Mäuse erfolgte an einem dafür vorgesehenen separaten Arbeitsplatz durch überdosierte Inhalationsnarkose in einem ausreichend groß dimensionierten Gefäß unter laufendem Abzug. Es erfolgte eine sorgfältige Sicherstellung des Todeseintritts nach anerkannten Kriterien: länger bestehender Atemstillstand, vollständiger Verlust des Muskeltonus, kein tastbarer Herzschlag und keine Reaktion auf Schmerzprovokation. Erst nach Überprüfung des sicheren Todeseintritts wurde der Thorax eröffnet, wobei durch die Testung des Vorliegens einer Asystolie eine erneute Überprüfung des Todes erfolgte. Die Gefäße wurden im folgendem nach Herzpunktion mit Puffer (PBS oder Sörensen, jeweils mit 1 % Procain-HCl zur Vasodilatation, abhängig von der folgenden Perfusionslösung) blutleer gespült und anschließend mit dem Fixans dem Mäusegewicht adaptiert perfundiert.

- **Perfusion der Kadaver**

Für die Eponeinbettung wurden die Kadaver zunächst mit 1 % Procain-HCl in Sörensen-Puffer gespült, um dann anschließend mit 6 % Glutaraldehyd (Agar, England) perfundiert zu werden.

Für die Paraffineinbettung wurden die Kadaver mit PBS-Puffer gespült und folgend mit entweder 4 % PFA-Lösung (Richard-Allan-Scientific, Thermo Scientific, Rockford, USA) oder modifizierter Bouin-Lösung (Hartmann et al., 1999) perfundiert. Bei allen verwendeten Antikörpern wurden bessere Ergebnisse bei einer Perfusion mit Bouin-



Lösung erzielt. Am Tag nach der Perfusion mit modifizierter Bouin-Lösung erfolgte eine Umbettung in 1 % PFA-Lösung.

Zur Aufarbeitung für die Rasterelektronenmikroskopie nach Osmiummaceration wurden die Kadaver mit 1 % Procain-HCl in PBS gespült und mit einer Lösung aus 0,5 % Glutaraldehyd und 0,5 % Paraformaldehyd perfundiert.

- **Aufarbeitung der Tiere für Western blot und qPCR**

Für die Verwendung für die qPCR wurden die Kadaver weder gespült noch perfundiert. Die Gewebeproben wurden direkt nach der Präparation in 1 ml Trizol (Invitrogen, Darmstadt) gegeben und anschließend in Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80° C.

Für die Verwendung für Western blots wurden die Kadaver ebenfalls nicht gespült bzw. perfundiert; die Gewebeproben wurden anschließend bei -80° C gelagert. Für beide Ansätze hatten Vorversuche gezeigt, dass ein Freispülen der Gefäße vor dem Einfrieren zu einer deutlich höheren Streuung der Messwerte führte.

### **3.2 Eponeinbettung**

Die präparierten Muskelschnitte wurden zunächst dreimal mit 0,1 M PBS Puffer gespült. Nach Osmierung mit 2 % OsO<sub>4</sub> (Serva, Heidelberg) über zwei Stunden mit anschließender dreimaliger Spülung mit PBS wurden die Gewebeproben in 30 %igem, 50 %igem, 70 %igem, 90 %igem und 100 %igem Ethanol entwässert. Nach zweimaliger Inkubation mit Propylenoxid (Merck, Darmstadt) für jeweils 15 Minuten wurden die Gewebeblöcke in ein Gemisch aus gleichem Anteil Propylenoxid und einem Gemisch aus Epon A und Epon B gelegt. Über Nacht wurden die Präparate in einer Lösung bestehend aus einem 3:1 Gemisch aus dem Epongemisch und Propylenoxid inkubiert. Die Polymerisierung wurde zunächst bei 40° C über etwa 6 Stunden initiiert und abgeschlossen mit einer Inkubationszeit über mindestens 12 Stunden bei 60° C.

Das mittels einer Fräse getrimmte Gewebeblöckchen wurde mit einem Ultramikrotom „RMC Powertome PT-XL“ (Reichert-Labtec, Wolfratshausen) bei 1 µm geschnitten und die Schnitte mit Toluidin Blau und Pyronin-G angefärbt.

- **Statistische Auswertung der Muskelfaserquerschnittsflächen**

Die Semidünnschnitte der Muskelfaserquerschnitte wurden unter dem Lichtmikroskop Nikon 80i bei einer Primärvergrößerung von 40x fotografiert bei einer Auflösung von 5 MP, in NIS-Elements AR 3.0 (Nikon software) einzeln markiert und vom Programm die Querschnittsflächen berechnet. Die statistische Auswertung sowie die graphische Darstellung erfolgten mit dem Programm XACT (SciLab, Hamburg, Deutschland) und Microsoft Excel 2010. Zu jedem Muskeltyp ist zum Zeitpunkt von jeweils 4, 8 und 12 Wochen jeweils links eine Boxplot-Darstellung angeführt. Die Boxplot-Darstellung gibt einen Überblick über die Beschaffenheit großer Datenmengen. Dabei umfasst der lange Strich die ganze Verteilung vom kleinsten bis zum größten Wert. Die Box wird außen von den Quartilen begrenzt, zwischen den Quartilen –also in der Box– liegen die mittleren 50 % der Verteilung. Der Querstrich in der Box markiert den Median. In der rechten Spalte ist die Verteilung der Querschnittsflächen dargestellt. In einem Balkendiagramm sind abschließend die durchschnittlichen Muskelfaserquerschnittsflächen im zeitlichen Verlauf zusammengefasst. Um zu testen, ob die Muskelfaserquerschnittsflächen zwischen den beiden Stichproben (Wildtyp und Knockout) sich signifikant unterscheiden oder die einander gleich sind, wurde mittels der GraphPad Software InStat 3 der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Es wurde jeweils zu einem definierten Zeitpunkt (4, 8 und 12 Wochen) das Signifikanzniveau der Muskelfaserquerschnittsflächen vom Wildtyp gegenüber dem Knockout errechnet. Das errechnete Signifikanzniveau ist jeweils in die Graphik mit der Zusammenstellung der Muskelfaserquerschnittsflächen eingetragen.

Bei einem angenommenen Irrtums- (Signifikanz-) niveau von 5 %, ist ein Wert für  $p > 0,05$  als nicht signifikant zu werten,  $p \leq 0,05$  ist schwach signifikant,  $p \leq 0,01$  sehr signifikant und  $p \leq 0,001$  hoch signifikant.

### **3.3 Aufarbeitung für Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurden repräsentative Eponblöcke mit der Diamantfräse auf eine Fläche von ca. 1 mm<sup>2</sup> zugespitzt und auf eine Dicke von 70 nm geschnitten. Die Schnitte wurden auf 300 Mesh Kupfernetze aufgebracht und mit Uranylacetat und Bleicitrat doppelt kontrastiert. Die Auswertung erfolgte in einem Zeiss

EM 910 bei 120 KV; dokumentiert wurde mit einer 1 MP Kamera (Tröndle, Deutschland) in Bottom-mount-Position, gesteuert von einer Olympus-SIS iTEM Software.

### **3.4 Paraffineinbettung**

Zur Paraffineinbettung wurden die Präparate zunächst in 0,1 M PBS gespült und anschließend jeweils dreimal für jeweils eine halbe Stunde zunächst in 50 %igem Ethanol und dann in 70 %igem Ethanol entwässert. Das weitere Procedere wurde vom Paraffin-Automaten (Programm 1) (Tissue-Tek VIP 5 Jr., Sakura, USA) durchgeführt. Nach Beendigung der weiteren Schritte der Paraffinierung durch den Automaten folgte das Ausrichten der Gewebeproben in Gussformen, das Ausgießen der Blöcke mit 60° C heißem Paraffin und anschließendem Abkühlen. Es wurden 10 µm dicke Mikrotomschnitte mit dem Rotationsmikrotom RM 2265 (Leica, Wetzlar) gewonnen, die zunächst in einem ca. 40° C warmen Wasserbad gestreckt wurden, um dann auf einen beschichteten Objektträger aufgezogen werden zu können. Die aufgezogenen Schnitte mussten schließlich noch über Nacht bei etwa 37° C bis 45° C getrocknet werden.

### **3.5 Immunhistochemie an Paraffinschnitten**

Die Paraffinschnitte wurden zunächst entparaffiniert (3x 10 Minuten Xylol (Merck, Darmstadt)) und durchliefen anschließend eine absteigende Alkoholreihe. Dabei blieben sie nacheinander jeweils zweimal für 7 Minuten in einem 100 %igem, 90 %igem, 70 %igem und 50 %igem Ethanolbad stehen. Die Antigenfreilegung wurde mit Citratpuffer bei pH 6 und 7 mit einer Einwirkzeit von 10 Minuten variiert (bei Murf1 Citratpuffer pH 6, bei ATPB und Mitofusin 2 Citratpuffer pH 7 erfolgreich). Alternativ wurde eine Vorbehandlung mit 0,1 mM kochender EDTA-Lösung bei pH 8 für 3 Minuten benutzt (bei Aconitase 2 erfolgreich). Der Versuch einer Vorbehandlung mit 0,025 %iger Trypsinlösung erbrachte bei keinem der verwendeten Antikörper ein verwertbares Ergebnis. Nach abgeschlossener Vorbehandlung wurden die Objektträger in eine abgeschlossene feuchte Kammer gelegt, in der sich dann die folgenden Behandlungsschritte anschlossen: Zunächst wurde mit einer zweimaligen PBS-Pufferlösung gespült, bevor die einstündige Blockung freier Proteinbindestellen mit 2 % BSA (Albumin, bovine Serum, Sigma, Steinheim) durchgeführt wurde. Der Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 mit 2 % Leerserum für etwa 24 Stunden im Kühlschrank bei 4° C

auf dem Objektträger belassen. Zur Kontrolle der Spezifität des Signals wurde ein Schnitt bei jeder Färbung ohne primären Antikörper inkubiert. Nach erneuter zweimaliger Blockierung mit dem Blockpuffer konnte der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen werden. Nach zweimaligem Auftragen des Blockpuffers für jeweils 5 Minuten folgte eine abschließende Behandlung mit einer Lösung aus dem Blockpuffer und Bisbenzimid (Fluka, Sigma, Steinheim) zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Zellkerne. Die Aufbewahrung der Schnitte erfolgt im Kühlschrank bei 3° C.

- **Mikroskopische Auswertung der Immunfluoreszenzpräparate**

Die mikroskopische Auswertung erfolgte an einem Nikon 90i Photomikroskop mit einer Nikon EZC1 Konfokaleinheit bei einer Aufzeichnung 2048 x 2048 Pixel x 16 bit Graustufen mit einem 30 µm („small“) Pinhole; Gain und Offset wurden pro Antikörper und Vergrößerung standardisiert.

### 3.6 qPCR

- **RNA Isolierung aus Gewebe**

Das Gewebe wurde zunächst aus den nicht perfundierten Mäusen entnommen, in Rundbodenröhrchen mit 1 ml Trizol (Invitrogen, Darmstadt) gegeben und anschließend in Stickstoff schockgefroren. Die Proben konnten entweder noch am gleichen Tag weiterverarbeitet werden oder bei -80° C gelagert werden.

Zur Weiterverarbeitung wurden die Proben auf Eis aufgetaut und mit 200 µl Chloroform versetzt. Anschließend standen die Proben zunächst zur Homogenisierung für 15 Sekunden auf Eis und anschließend für 3 Minuten bei Raumtemperatur. Im Weiteren wurden die Proben für 15 Minuten bei 4° C gelagert und dann bei 12.000xg zentrifugiert. Der gewonnene klare Überstand wurde in ein neues 2 ml Rundbodenröhrchen abpipettiert. Pro 1 ml Gemisch wurden 500 µl Isopropanol (Merck, Darmstadt) zugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde nach einer weiteren Inkubation für 15 Minuten bei 4° C und Zentrifugation bei 12.000xg entfernt. Das gewonnene Pellet wurde zweimal in je 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen und anschließend gevortext. Es schloss sich eine Inkubation für 3 Minuten bei 4° C mit folgender Zentrifugation bei 7500xg an. Nach 10-minütiger Trocknung der Pellets bei Raumtemperatur schloss sich eine Resuspension in 1 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Wasser pro 1 mg Gewebe an. Einem Abkühlen für 10 Minuten auf Eis folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 65° C mit erneut anschließender Abkühlung auf Eis für 10 Minuten. Die Proben konnten dann bei -80° C eingefroren werden.

- **Reverse Transkription**

Die reverse Transkription wurde mittels des First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche, Basel) unter Einhaltung der vom Hersteller gegebenen Durchführungsbeschreibung vollzogen. An die am 3'-Ende positionierte RNA Sequenz bestehend aus bis zu 200 Adenylatresten (Poly-A-Schwanz) bindet ein Oligo-(dT)-Primer. Der Primer dient als Startpunkt für die RNA-abhängige Polymerase, die von dort aus die RNA in DNA umschreibt. Die Menge an zu verwendender RNA wurde zunächst abhängig von der jeweils gemessenen RNA-Konzentration bestimmt, sodass eine Endkonzentration von 1 µl totaler RNA im Ansatz vorhanden war. Der Gesamtansatz betrug 13 µl. Zu der RNA wurden 2 µl der Random hexamer Primer (600 pmol/µl) (Roche, Basel) und 1 µl Anchored oligo dt Primer (Roche, Basel) zugegeben. Während der anschließenden Inkubation bei 65° C für 10 Minuten im Thermoblock mit Deckelheizung (zur Verringerung der Verdampfung) kam es zum sogenannten Annealing, der Anlagerung des Primers an die RNA. Die Proben wurden anschließend gleich auf Eis gestellt und ein Master-Mix angesetzt (Zusammensetzung s. Anhang).

Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren des Master-Mixes wurden 7 µl des Mastermixes zu den 13 µl Ansatz pipettiert. Die Extension fand in zwei Inkubationszyklen statt: 10 Minuten bei 25° C und anschließend 30 Minuten bei 55° C. Anschließend wurden die Proben zur Denaturierung der Reversen Transkriptase bei 85° C inkubiert, um eine weitere Interaktion des Enzyms mit in der PCR zugegebenen Reagenzien zu unterbinden.

- **Quantitative Echtzeit RT-PCR mit dem LightCycler**

Die RT-PCR dient der Untersuchung von Expressionsunterschieden von zuvor in cDNA umgeschriebener RNS.

Der LightCycler (Roche Diagnostics GmbH) ist ein sehr schneller Thermozykler. Er besteht aus einer zylindrischen Kammer, in der ein schneller Temperaturwechsel durch einen mittels eines Föns erzeugten Luftwirbels stattfindet. Als Reaktionsgefäße dienen Glaskapillaren mit einem niedrigen Volumen von 25 µl und einer großen Oberfläche, um die Umgebungstemperatur schnell auf das Reaktionsgemisch zu übertragen. Eine Diode

emittiert blaues Licht, das die Fluoreszenzfarbstoffe, die während der Amplifikation an die DNA binden, anregt. Photodioden registrieren schließlich die von der Kapillarenspitze ausgehende Lichtemission. Die Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen an die DNA erfolgt in der Elongationsphase, in der die Intensität der Fluoreszenzsignale ansteigt. In der Denaturierungsphase fällt die Fluoreszenzintensität jedes Mal wieder rapide ab.

- **Primer und Sonden Design**

Die Primer liegen an der Exon/ Intron Grenze („intron-spanning“). Kommt es zur Anlagerung der Primer an genomische DNA, entstehen Amplifikate einer anderen Größe als bei der Anlagerung an cDNA. Um die Maskierung der DNA-Sequenz für die Sonden durch die Anlagerung der Primer zu verhindern, liegen die Schmelzpunkte der Sonden durchschnittlich 15° C höher als die der Primer. So ist eine Anlagerung der Sonden vor den Primern gewährleistet.

Um Ziel-DNA sequenz-spezifische Oligonukleotide einzusetzen, wurden TaqMan-Sonden (Roche, Basel) gekoppelt mit Fluoreszenzfarbstoffen verwendet.

Der relative, quantitative Vergleich an mRNA wurde von den Sonden SERCA 1, SERCA 2, Mitofusin 2, 5-prime-AMP-activated protein kinase (Ampk) und Sirt1 gegenüber dem Housekeeping Gen GAPDH als Ladekontrolle getestet.

SERCA ist im sarkoplasmatischen Retikulum innerhalb der Muskelzelle lokalisiert. Es handelt sich hierbei um eine Calcium ATPase, die Calcium vom Zytosol in das Lumen des SR mittels ATP-Hydrolyse transportiert. Das SERCA 1 Gen wird ausschließlich in Typ 2 (fast-twitch) Fasern exprimiert, wohingegen SERCA 2 ausschließlich in Typ 1 (slow-twitch) Fasern vorkommt. Mitofusin 2 ist ein mitochondriales Membranprotein, das an der Mitochondrienfusion in Säugetieren beteiligt ist. Ampk dient als Energiesensor, eine metabolische Stress-Sensor-Proteinkinase. Ampk ist aus einer katalytischen  $\alpha$ -Untereinheit aufgebaut und aus zwei nicht-katalytischen Einheiten:  $\beta$  und  $\gamma$ . Sirt1 dient ebenfalls als Energiesensor.

Die Expression von NAD2 (mtDNA) wurde mit dem ebenfalls als „single-copy gene“ vorliegenden Galnt4 (nDNA) verglichen.

Die jeweiligen Sonden wurden an Gewebeproben von 4 Wochen und 12 Wochen alten Mäusen getestet. Als Gewebeprobe wurde die Milz, der M. quadriceps femoris und die Bauchwandmuskulatur verwendet. Die Sonden für die Gene SERCA 1, SERCA 2, Mitofusin 2, 5-prime-Amp-activated protein kinase (Ampk) und Sirt1 wurden an Milz- und

Quadriceps-Proben von jeweils drei Wildtyp- und drei Knockout-Mäusen getestet. Die Sonde für das NAD2-Gen wurde sowohl an Bauchwandmuskulatur als auch an Quadricepsmuskulatur von 12 Wochen alten Mäusen eingesetzt. Bei jedem Durchlauf wurde als Negativkontrolle Wasser mitgeführt.

Bei der Durchführung einer RT-PCR können Ergebnisverfälschungen durch Unterschiede in der Ausgangsmenge an RNA, Unterschiede in der Reversen Transkriptase oder der PCR-Effizienz auftreten. Um diese Faktoren auszugleichen, wird die Expressionsrate eines zu untersuchenden Ziel-Gens einem Referenzgen gegenübergestellt. Referenzgene kodieren für Proteine, die eine lebensnotwendige Funktion bei der Erhaltung der Zellfunktion haben. Somit erhält man letztlich die Expressionswerte des Ziel-Gens relativ zu einer internen Kontrolle.

- **Spezifitäts-/ Reinheitstestung der Primer und Sonden**

Um sicherzustellen, dass das für die qPCR verwendete Produkt aus Primer, Sonde und cDNA nicht mit genomischer DNA kontaminiert ist, wurde das Produkt in der Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Durch Färbung des Gels mit Ethidiumbromid konnten die Amplifikationsprodukte unter UV-Licht Bestrahlung sichtbar gemacht und fotografiert werden. Zeigte sich nur eine einzige Bande, die eine mit dem jeweils verwendeten Primer und der Sonde übereinstimmende Amplifikatlänge ergab, so konnte eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Die Unterscheidung zwischen Amplifikationsprodukten aus genomischer DNA und cDNA liegt in der Länge: Genomische DNA umfasst im Gegensatz zu cDNA Introns und führt somit zu längeren Amplifikationsprodukten als cDNA, die allein aus Exons besteht.

- **Auswertung der qPCR- Ergebnisse**

Um eine Aussage über die mRNA Menge eines zu untersuchenden Gens machen zu können, wird der Quotient aus dem Crossing point des zu untersuchenden Gens und dem von GAPDH gebildet. Der Crossing point bezeichnet den Punkt, an dem die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts sich statistisch signifikant von denen des Hintergrunds abheben; er befindet sich am Beginn der log-linearen Phase und entspricht mathematisch dem Wendepunkt der 2. Ableitung. Der Crossing point gibt somit eine quantitative Aussage über die Ausgangsmenge an Ziel-DNA.

Aus den erhaltenen Quotienten der Crossing points aller Wildtypen und Knockouts wurden Mittelwerte gebildet, die dann in einem Balkendiagramm dargestellt wurden.

Bei den Auswertungsdiagrammen der qPCR-Ergebnisse zeigen die einzelnen Säulen den jeweils gebildeten Mittelwert aus den Quotienten der Crossing points (Cp Sonde/ Cp GAPDH bzw. Galnt4) mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die erste Säule stellt den Mittelwert aus den gebildeten Quotienten der Crossing points für die 4 Wochen alten Wildtyp-Muskelproben dar, die zweite Säule die der gleichaltrigen Knockout-Proben. Die dritte Säule stellt den Mittelwert aus den gebildeten Quotienten der Crossing points der 12 Wochen alten M. quadriceps femoris-Proben dar, die vierte Säule die der gleichaltrigen Knockout-Proben. Es wird jeweils die erste mit der zweiten bzw. die dritte mit der vierten Säule verglichen.

### 3.7 Western Blot

- **Zellen lysieren**

Die Gewebeproben wurden zunächst mit IPB Lysatpuffer und EDTA sowie PMSF als Proteaseinhibitoren versetzt und anschließend mittels Ultraturax bearbeitet. Im Weiteren wurden die Proteinkonzentrationen von dem schließlich erhaltenen Zelllysat bestimmt.

- **Proteinbestimmung**

Die Methode nach Bradford et al. (1976) dient der Proteinbestimmung. Dabei erfolgt der quantitative Nachweis des Proteingehalts durch Farbreaktionen funktioneller Gruppen der Proteine mit farbstoffbildenden Reagenzien. Die Intensität des Farbstoffs ist direkt proportional zur Konzentration der reagierenden Gruppen und kann photometrisch bestimmt werden. Zur Erstellung der Eichkurve wurde Rinderserum- Albumin (BSA) (Thermo Scientific, Rockford, USA) verwendet. Die entsprechenden Proben wurden jeweils unverdünnt oder verdünnt mit destilliertem Wasser mit der Lösung BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, USA) versetzt, gemischt und für mindestens 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm am Spektrophotometer.

- **SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die Proben wurden zunächst abhängig von der bestimmten Proteinkonzentration mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 9,75 µl aufgefüllt, mit 3,75 µl LDS Puffer und abhängig davon, ob reduziert bzw. nicht-reduziert mit 1,5 µl DTT bzw. destilliertem Wasser versetzt. Das Gemisch wurde dann für 5 Minuten auf 95° C erhitzt, um die Tertiär- und Sekundärstruktur durch Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen



aufzulösen. Die Proteingemische wurden anschließend in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen aufgetragen (NuPage Novex Bis-TrisGel, Invitrogen, Darmstadt). Die folgende Elektrophorese erfolgte über eine Stunde in einer Elektrophoresekammer mit Laufpuffer (NuRunning Puffer, Invitrogen, Darmstadt) bei einer Stromstärke von anfänglich 100-125 mA und am Ende von 60-80 mA; die Spannung wurde dabei konstant bei 200 V gehalten.

- **Western Blot**

Nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine zu diesem Zweck vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham Biosciences, Freiburg) transferiert. Der Transfer wurde vertikal in einer mit Transferpuffer (Invitrogen, Carlsbad, USA) gefüllten Kammer bei einer konstanten Spannung von 30 V und einer Stromstärke am Anfang von 170 mA und am Ende von 110 mA über eine Stunde durchgeführt.

- **Immunfärbung der Proteine**

Die Membran wurde zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Roti-Block (Roth, Karlsruhe) 1x abgesättigt, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Anschließend folgte eine Inkubation über Nacht bei 4° C mit einem in Roti-Block 1:500 bis 1:8.000 (Ak-abhängig) verdünnten spezifischen Antikörper mit folgendem etwa 30-minütigem Waschen mit einer Lösung aus PBS und Tween 20, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper, der eine Spezifität für den ersten Antikörper aufweist, wurde daraufhin 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit anschließendem Waschschrift wie nach dem ersten Antikörper.

Die Membran wurde zur Signalverstärkung für 5 Minuten mit Super Signal (Thermo Scientific, Rockford, USA) inkubiert und anschließend zwischen Fließpapier getrocknet. Folgende Antikörper wurden an drei Wildtyp- gegen drei Knockout-Muskelproben sowohl von 4 Wochen als auch 12 Wochen alten Proben verglichen: SDHA, ATPB, Apg 7, VDAC, Mitofusin 2 und Anti-phosphor Ampk  $\alpha$ .

- **Densitometrische Bestimmung von Proteinbanden**

Der Western blot wurde zur densitometrischen Bestimmung mit einer elektronischen Kamera (BioRadVersaDoc 4000 MP) aufgenommen. Die gleichmäßige Lane-Beladung wurde durch photometrische Quantifizierung der Proteinkonzentration im Extrakt gesichert und etwaige kleinere Differenzen der Beladung bzw. des Blot-Transfers durch zusätzliche Kalibration via Western Blot eines 'Housekeeping'-Proteins berücksichtigt.

Dazu wurde mithilfe des Programms Quantity One (Bio Rad, München) die Intensität und Größe der Banden des untersuchten Antikörpers gegenüber dem 'Housekeeping'-Protein GAPDH berechnet. Es wurden die einzelnen Banden markiert und mittels des Quantifikation-Tools von BioRad das prozentuale „adjusted volume“ jeder Bande berechnet. Die so errechneten Werte sind ein Ausdruck für die relative Proteinbeladung, die sich auf einem Blot befinden, so dass ein Vergleich absoluter Werte zwischen unterschiedlichen Gelen nicht möglich ist. Dieses Verfahren wurde sowohl für die Banden nach Inkubation des jeweiligen Antikörpers als auch nach Inkubation mit GAPDH durchgeführt. In einem 2. Schritt wurde dann der Quotient aus dem berechneten prozentualen „adjusted volume“ nach Inkubation mit dem Antikörper und dem prozentualen „adjusted volume“ der Bande nach Inkubation mit GAPDH gebildet. Bei einem Einsatz von drei Muskelproben konnten somit drei Quotienten gebildet werden, deren Mittelwert in einem Balkendiagramm mit der Standardabweichung im Ergebnisteil dargestellt wird. Verglichen wird schließlich die relative Differenz zwischen Wildtyp und Knockout.

### **3.8 TUNEL-Färbung**

Der TUNEL Assay ist eine Methode zur Apoptosetestung, der die gemeinsame Endstrecke verschiedener Apoptose-Aktivierungswege über die Erfassung der Fragmentierung in Nucleosomen erfasst. In der Endphase der Apoptose wird die DNA durch die Aktivierung von Endonukleasen fragmentiert. An jedem Bruchende wird dabei eine 3'OH-Gruppe frei, die katalysiert durch die im Kit enthaltene terminale Deoxynucleotidyltransferase (TdT) mit einem Digoxigenin-markierten Nukleotid versehen wird. An die Digoxigenin-markierten Nukleotide bindet ein Anti-Digoxigenin Antikörper, der an ein Peroxidase-Reporter Molekül gekoppelt ist. Dadurch entsteht eine intensive, permanente, lokalisierte Färbung, die lichtmikroskopisch sichtbar wird. Der verwendete ApopTag®Kit (Millipore, MA, USA) erkennt sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA-Strangbrüche, die durch die Apoptose induziert wurden. Es können sogar Frühstadien der Apoptose, in denen Chromatinkondensation begonnen hat, aber nur wenige Strangbrüche vorliegen und der Kern noch keine erkennbaren morphologischen Veränderungen aufweist, detektiert werden. Als Gewebeproben wurden Quadriceps- und Milzproben von mit modifizierter Bouin-Lösung perfundierten Tieren verwendet, die

in Paraffin eingebettet waren. Die Verwendung des Kits wurde gemäß dem dem Kit beiliegenden Protokoll durchgeführt.

### **3.9 Aufarbeitung für das Rasterelektronenmikroskop (REM)**

Zur Mazeration in Osmiumtetroxyd wurden die Gewebeproben am Vibratom (VT 1200 S, Leica, Wetzlar) zu 250 bis 300 µm dicken Schnitten aufgearbeitet. Nach dreimaligem Spülen in PBS für jeweils 10 Minuten folgte eine einstündige Inkubation in einer Lösung aus Osmiumtetroxyd ( $\text{OsO}_4$ ) und 1,25 %  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  in destilliertem Wasser im Dunkeln auf dem Schüttler. Die Schnitte wurden anschließend erneut drei Mal für jeweils 10 Minuten gespült, dem schloss sich eine Osmierung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rüttler an. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Schnitte für 40 Stunden in 0,1 %  $\text{OsO}_4$  inkubiert.

Ein letzter Waschschrift mit PBS wurde vor der aufsteigenden Alkoholreihe durchgeführt. Die Alkoholreihe wurde mit zwei Mal 10-minütigem Baden in 50 %igem Alkohol begonnen und dann auf 70 %igen, 90 %igen und 100 %igen Alkohol hochgefahren. Auf die Alkoholreihe folgte eine Acetonreihe, die mit einer Lösung aus 100 %igem Aceton in 100 %igem Ethanol im Verhältnis 1:2 für 20 Minuten initiiert wurde. Das Aceton-Ethanol-Verhältnis wurde dann auf 1:1 im folgenden Schritt erhöht, bis im 3.Schritt ein 2:1 Verhältnis verwendet wurde. Abgeschlossen wurde die Acetonreihe mit einer zwei Mal 20-minütigen Inkubation in 100 %igem Aceton. Nachdem die Gewebeproben getrocknet und auf Stubs aufgeklebt wurden waren, wurden sie für 30 Sekunden mit Platin/Palladium besputtert.

Die Bilder wurden mit einem JEOL 7500 F Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop (Jeol, München) aufgenommen.

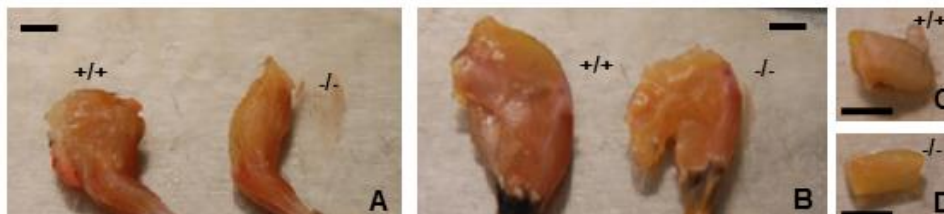
## 4. Ergebnisse

### 4.1 PARL-Defizienz führt bis zur 12. postnatalen Woche zu einer deutlichen Reduktion der Muskelfaserquerschnittsfläche

Cipolat et al. (2006) haben gezeigt, dass die postnatale Gewichtszunahme der PARL-Knockout Mäuse bis etwa zu der 4. Woche annähernd normal verläuft und danach hinter der der Kontrolltiere zurückbleibt.

Mit Blick auf die maximale Lebenserwartung von etwa 12 Wochen bei PARL-defizienten Mäusen wurde für diese Studie eine Zeitserie mit Probenentnahme bei 4, 8 und 12 Wochen alten Tieren etabliert. Als Proben wurde der M. quadriceps femoris, der M. tibialis anterior, der M. biceps brachii und die Bauchwandmuskulatur gewählt, um Muskeln aus unterschiedlichen Körperregionen zu erfassen.

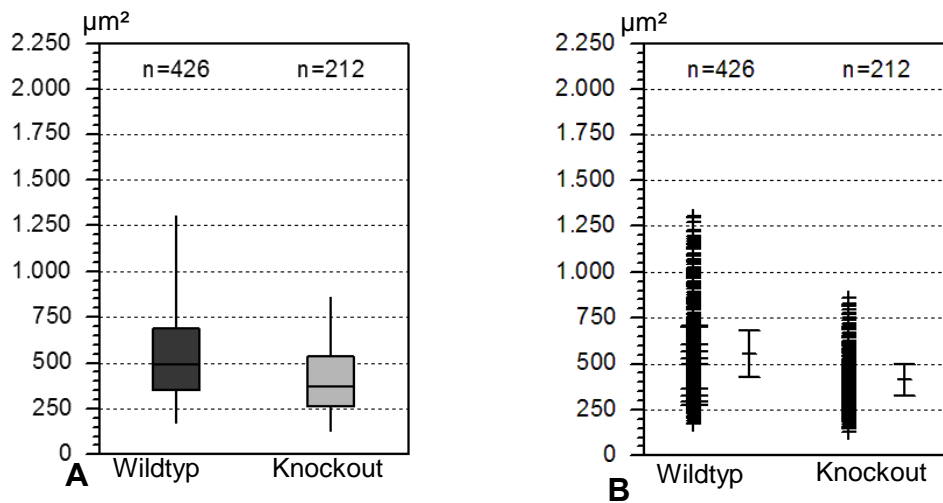
Bei allen 4 untersuchten Muskeln waren die Muskelfaserquerschnittsflächen zwischen PARL-defizienten Mäusen gegenüber den Wildtyp-Tieren bis zum Zeitpunkt von 12 Wochen um bis zu 50 % gegenüber dem Wildtyp reduziert (Abb. 5+6+9+11). Im Verlauf der Abnahme und der Kinetik unterscheiden sich jedoch die unterschiedlichen Muskeln, wie in den Abschnitten für die einzelnen Muskeln beschrieben wird.



**Abb. 4: Makroskopische Morphologie der Extremitätenmuskulatur bei Wildtyp und PARL-defizienten Mäusen** (Maßstab in A+B = 10 mm; C+D = 5 mm)

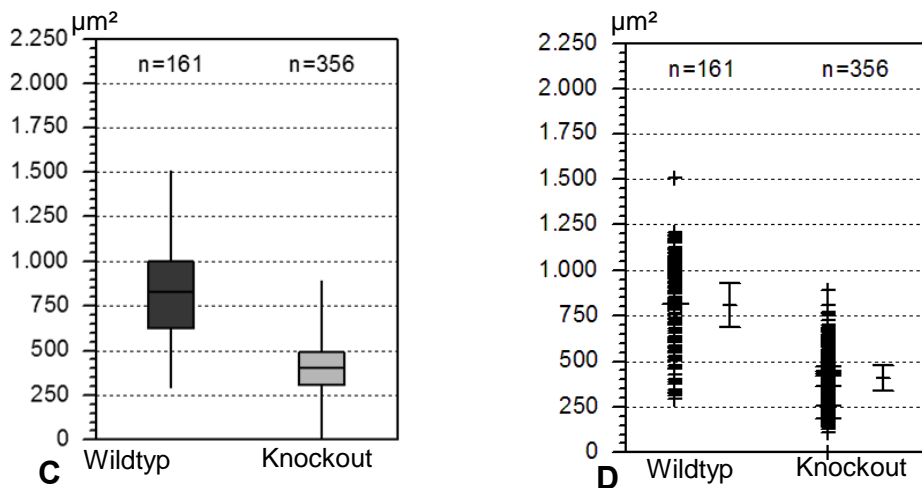
Bereits makroskopisch fällt bei der Muskulatur der vorderen (A) und hinteren (B) Extremität bei Wildtyp- und PARL-defizienten Mäusen im Alter von 12 Wochen eine deutliche Muskelmassendifferenz auf (Abb. 4a+b). Diese Differenz ist auch bei individuellen Muskeln (M. quadriceps femoris, Abb. 4c+d) nachweisbar.

- **Musculus biceps brachii**



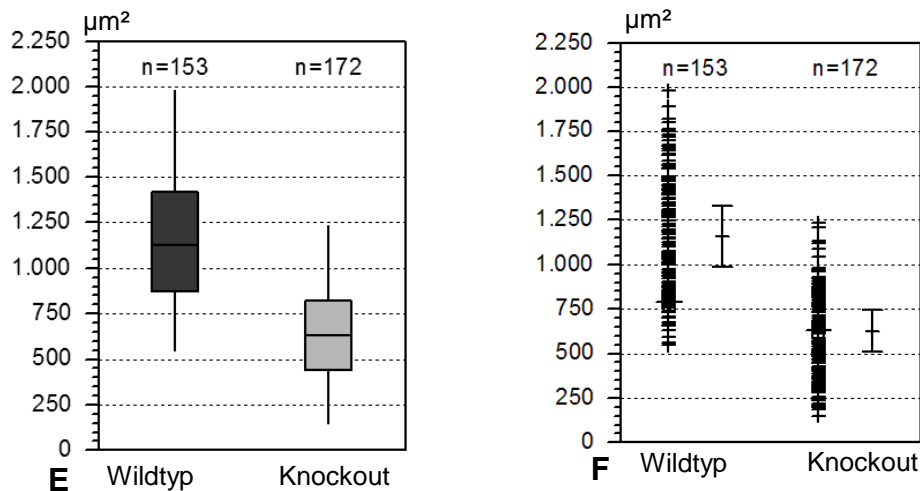
**Abb. 5: A+B:** 4 Wochen alte Mäuse

**Wildtyp:** Ø 553 ± 12,5 μm²; **Knockout:** Ø 412 ± 11,9 μm²



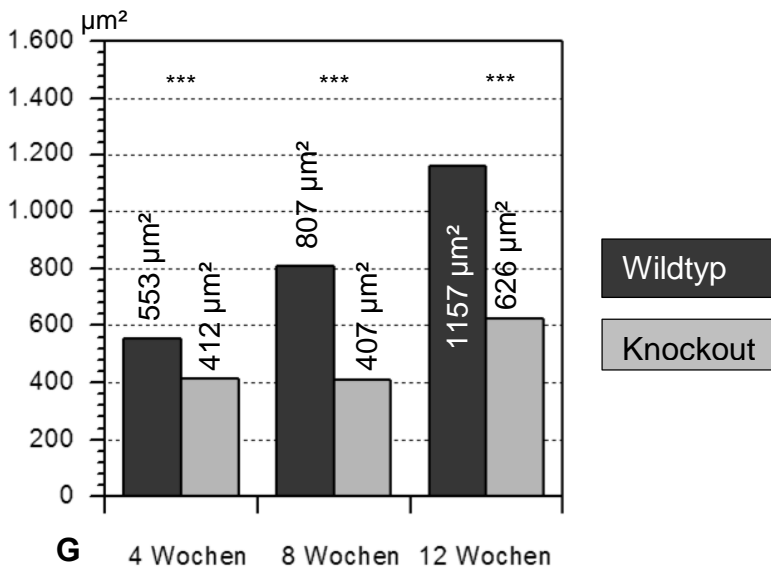
**Abb. 5 C+D:** 8 Wochen alte Mäuse

**Wildtyp:** Ø 807 ± 19,1 μm²; **Knockout:** Ø 407 ± 7,4 μm²



**Abb.5 E+F:** 12 Wochen alte Mäuse

**Wildtyp:**  $\bar{x}$  1157  $\pm$  27,3  $\mu\text{m}^2$ ; **Knockout:**  $\bar{x}$  626  $\pm$  17,9  $\mu\text{m}^2$

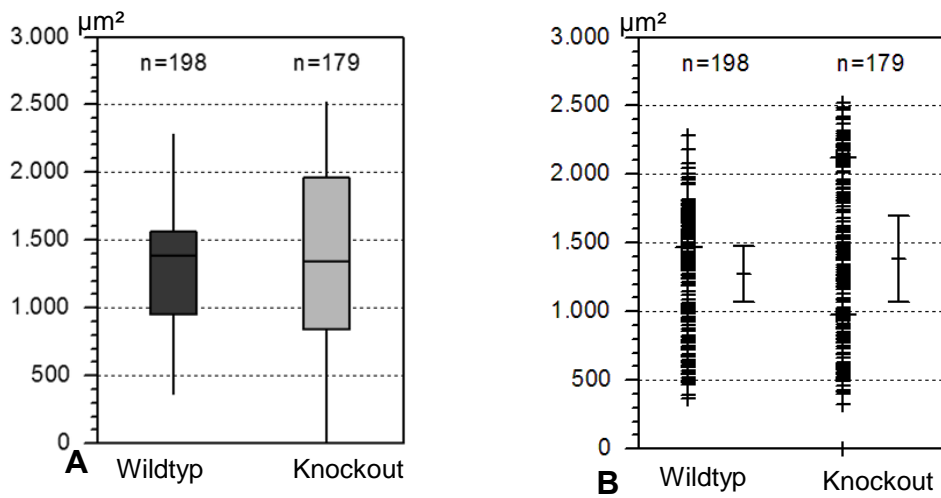


**Abb. 5g:** Die PARL-defizienten Mäuse zeigen eine Muskelfaserquerschnittsflächenzunahme des Musculus biceps brachii im Zeitverlauf von 4 bis 12 Wochen, jedoch gegenüber dem Wildtyp ist diese um 50 % reduziert. Zu allen drei Zeitpunkten unterscheiden sich die Muskelfaserquerschnittsflächen zwischen Wildtyp und Knockout hoch signifikant ( $p < 0,0001$ , \*\*\* (Erläuterung der Signifikanzgrenzen s. Methodenteil unter 3.2 „Statistische Auswertung der Muskelfaserquerschnittsflächen“)).

Wie Abb. 5g zeigt, nimmt die Muskelfaserquerschnittsfläche des M. biceps brachii zwar bei den PARL-Knockout Mäusen im Verlauf zu, bleibt aber gegenüber der der Wildtyp-Mäuse zurück. Bei den Wildtyp-Mäusen ist über den Verlauf von der 4. bis zur 12. Woche eine kontinuierliche, lineare Größenzunahme zu verzeichnen mit insgesamt

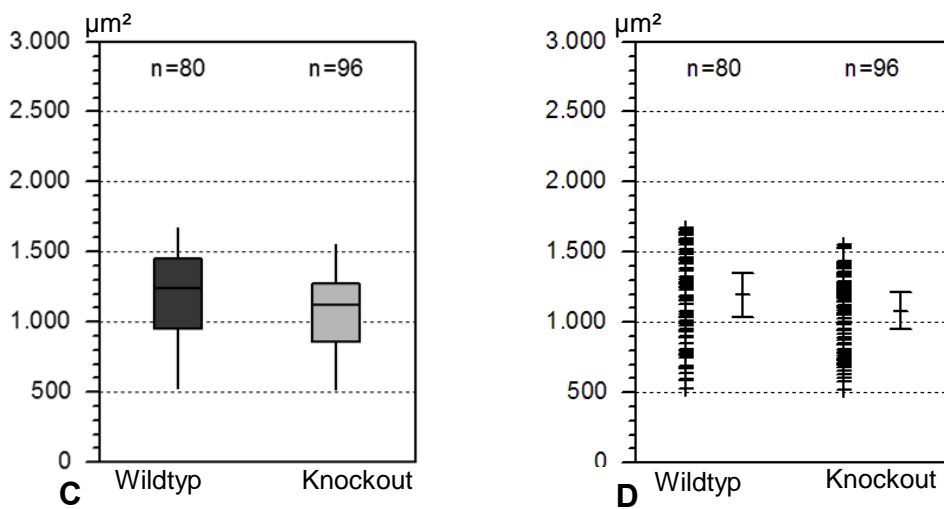
einer Verdopplung der Muskelfaserquerschnittsfläche (Abb. 5g). Die Muskelfaserquerschnittsfläche des M. biceps brachii bei den PARL-defizienten Mäusen ist von der 4. auf die 8. Woche konstant, steigt dann aber von der 8. auf die 12. Woche an, wobei sie gegenüber der Wildtyp-Maus am Ende um etwa 50 % zurückbleibt. Im Alter von 4 Wochen besteht bei den Knockout-Mäusen ein nur geringer Faserquerschnittsflächenunterschied zu den Wildtyp-Mäusen. Der Durchschnitt der Muskelquerschnittsflächen liegt bei den Wildtyp-Mäusen bei  $553 \pm 12,5 \mu\text{m}^2$  gegenüber  $412 \pm 11,9 \mu\text{m}^2$  bei den Knockout-Mäusen (Abb. 5a+b). Zum Zeitpunkt von 8 Wochen besteht bereits ein Größenunterschied von etwa 50 %. Zu diesem Zeitpunkt beträgt der Durchschnitt der Muskelfaserquerschnittsflächen bei den Wildtyp-Mäusen  $807 \pm 19,1 \mu\text{m}^2$  gegenüber einer durchschnittlichen Größe von  $407 \pm 7,4 \mu\text{m}^2$  bei den Knockout-Mäusen (Abb. 5c+d). Es ist zu beachten, dass die Muskelfaserquerschnittsflächen bei Knockout-Mäusen gegenüber den mit 4 Wochen erreichten Werten nicht mehr angestiegen sind und daher bereits zum Zeitpunkt von 8 Wochen eine Größendifferenz von 50 % vorliegt. Bis zum Zeitpunkt von 12 Wochen ist eine Muskelfaserquerschnittsflächenvergrößerung sowohl bei Wildtyp- als auch bei Knockout-Mäusen zu verzeichnen; der relative Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout hat sich jedoch gegenüber 8 Wochen nicht vergrößert. Der Durchschnitt der Muskelfaserquerschnittsfläche beträgt zum Zeitpunkt von 12 Wochen bei den Wildtyp-Mäusen  $1157 \pm 27,3 \mu\text{m}^2$  gegenüber  $626 \pm 17,9 \mu\text{m}^2$  bei den Knockout-Mäusen (Abb. 5e+f). Die Berechnung des Signifikanzniveaus mittels des Mann-Whitney Tests (Erläuterung zur statistischen Auswertung s. Methodenteil unter 3.2) ergab zu allen drei bestimmten Zeitpunkten eine hoch signifikant reduzierte Muskelfaserquerschnittsfläche PARL-defizienter Mäuse gegenüber dem Wildtyp (s. Abb 5g). Die Spannweite der Muskelzellgröße ist zu allen drei bestimmten Zeitpunkten bei den Wildtyp-Mäusen größer verglichen mit den gleichaltrigen Knockout-Mäusen. Zum Zeitpunkt von 4 Wochen ist die Streuung der Wildtyp-Tiere gegenüber den Knockouts vergleichbar (Abb. 5b). Zum Zeitpunkt von 8 Wochen hat sich die Streuung bei den Wildtyp-Tieren gegenüber der der 4 Wochen alten Tiere vergrößert und beträgt mehr als das Doppelte gegenüber der der Knockout-Mäuse (Abb. 5d). Am Ende der Zeitreihe bei 12 Wochen hat sich die Spannweite der Muskelfaserquerschnittsfläche gegenüber der Streuung bei 8 Wochen deutlich erhöht; die Wildtyp-Tiere zeigen aber auch hier eine größere Streuung gegenüber der der Knockout-Tiere (Abb. 5f).

- **Musculus quadriceps femoris**



**Abb. 6 A+B:** 4 Wochen alte Mäuse

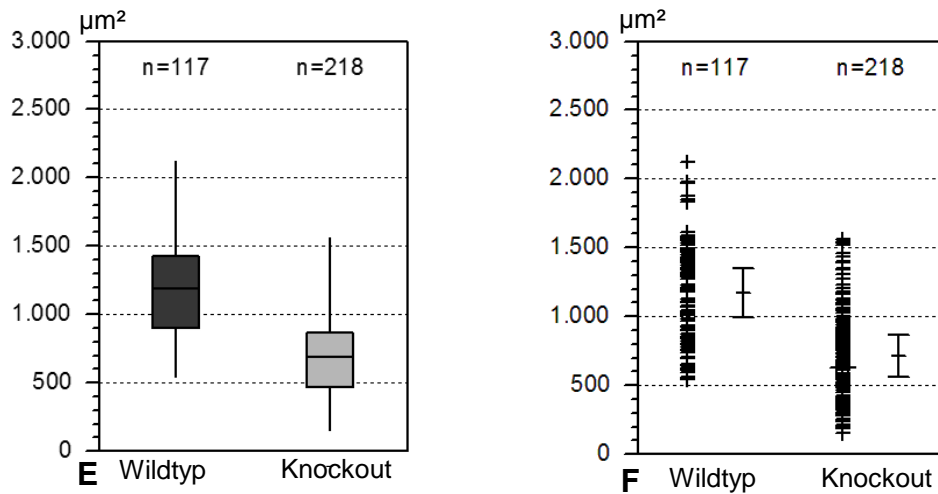
**Wildtyp:**  $\bar{x}$  1272  $\pm$  29,4  $\mu\text{m}^2$ ; **Knockout:**  $\bar{x}$  1384  $\pm$  46,9  $\mu\text{m}^2$



**Abb.6 C+D:** 8 Wochen alte Mäuse

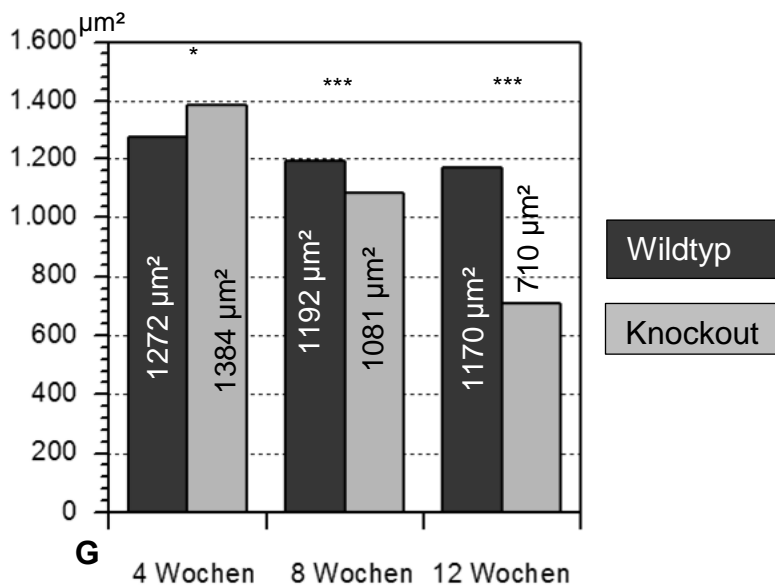
**Wildtyp:**  $\bar{x}$  1192  $\pm$  35,3  $\mu\text{m}^2$ ; **Knockout:**  $\bar{x}$  1081  $\pm$  26,4  $\mu\text{m}^2$





**Abb.6 E+F:** 12 Wochen alte Mäuse

**Wildtyp:** Ø 1170 +/- 32,5 μm²; **Knockout:** Ø 710 +/- 20,6 μm²

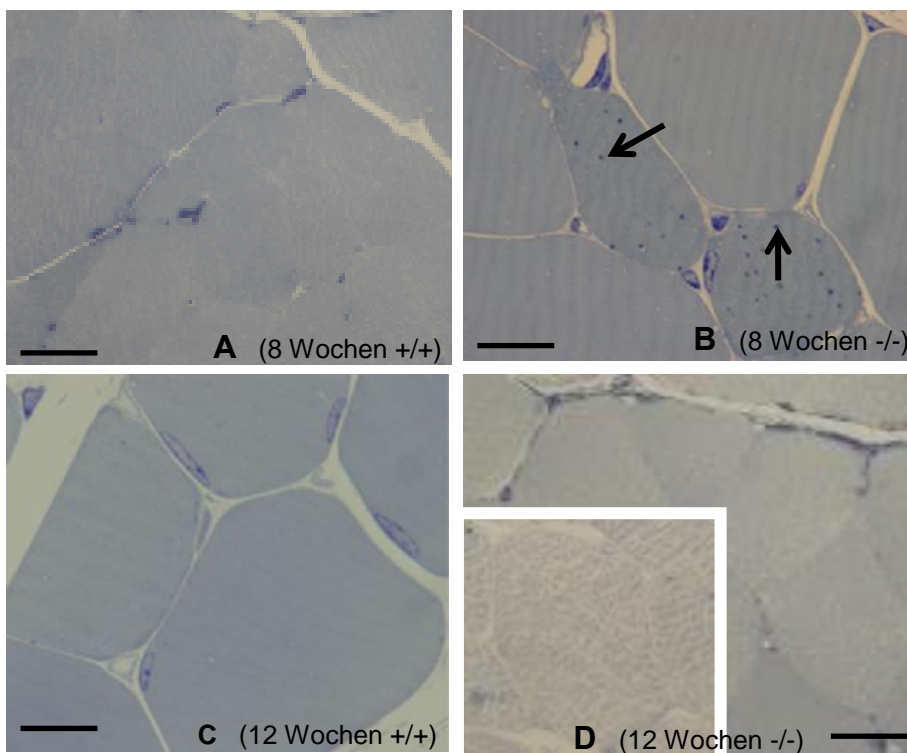


- **Abb. 6g:** Die Querschnittsfläche des Musculus quadriceps femoris von Knockout-Mäusen ist zum Zeitpunkt von 12 Wochen gegenüber der Wildtyp-Muskulatur um 40 % reduziert. Eine hoch signifikante Muskelfaserquerschnittsflächendifferenz zwischen Wildtyp und Knockout liegt ab der achten Woche vor ( $p < 0,0001$ , \*\*\*,  $p < 0,1662$ , \* - nicht signifikant (Erläuterung der Signifikanzgrenzen s. Methodenteil unter 3.2 „Statistische Auswertung der Muskelfaserquerschnittsflächen“)).

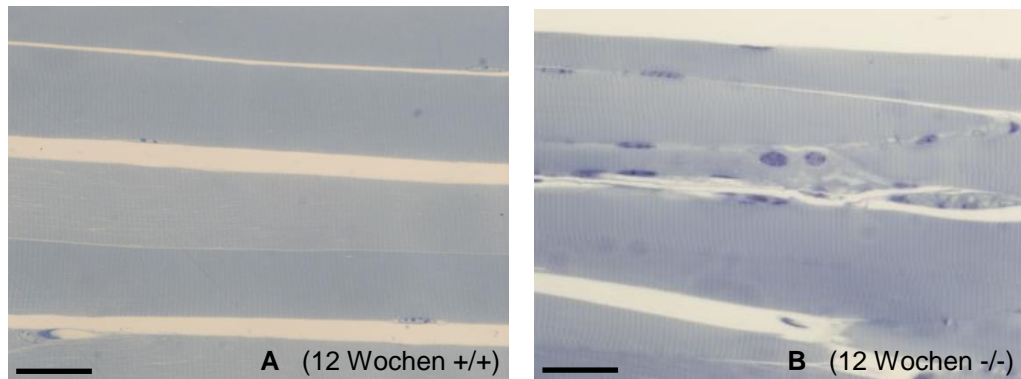
Die PARL-defiziente Quadricepsmuskulatur zeigt zum Zeitpunkt von 12 Wochen gegenüber 4 Wochen eine deutliche Muskelfaserquerschnittsflächenreduktion um 40 % (Abb. 6g), wobei die Größe der Wildtyp-Tiere zum Zeitpunkt von 4 und 12 Wochen nur minimal differierende Werte aufweist. Im Alter von 4 Wochen erreicht der M. quadriceps

femoris mit einer Querschnittsfläche von  $1272 \pm 29,4 \mu\text{m}^2$  bei den Wildtypen gegenüber  $1384 \pm 46,9 \mu\text{m}^2$  bei den PARL-defizienten Mäusen die höchsten Werte (Abb. 6a+b). Der Durchschnitt der Muskelfaserquerschnittsflächen bei 8 Wochen liegt für den Wildtyp bei  $1192 \pm 35,3 \mu\text{m}^2$  und für den Knockout bei  $1081 \pm 26,4 \mu\text{m}^2$  (Abb. 6c+d); es liegt somit ab der 8. Woche eine hoch signifikant reduzierte Muskelfaserquerschnittsfläche beim Knockout gegenüber dem Wildtyp vor (Berechnung des Signifikanzniveaus mittels des Mann-Whitney Tests, Erläuterungen s. Methodenteil unter 3.2). Zum Zeitpunkt von 12 Wochen hat sich die Querschnittsfläche der PARL-defizienten Muskulatur auf  $710 \pm 20,6 \mu\text{m}^2$  gegenüber  $1170 \pm 32,5 \mu\text{m}^2$  bei der Wildtyp-Muskulatur verringert (Abb. 6e+f).

Bei der PARL-defizienten Muskulatur hat die Streuung zum Zeitpunkt von 4 Wochen ihr Maximum erreicht (Abb. 6b) und bis zur 12. Wochen nimmt die Streuung immer weiter ab (Abb. 6f). Bei der Wildtyp-Muskulatur ist die Streuung zu allen drei Zeitpunkten ähnlich (Abb. 6b+d+f).



**Abb. 7: Histopathologie des Musculus quadriceps femoris (Kunsthazeinbettung, Semidünnschnitt bei  $1 \mu\text{m}$ ). Die Pfeile markieren eine zum Zeitpunkt von 8 Wochen vorliegende basophile Tüpfelung beim Knockout. In der PARL-defizienten Muskulatur fällt zum Zeitpunkt von 12 Wochen eine aufgelockerte Faseranordnung auf.** (Maßstab in A+B =  $15 \mu\text{m}$ , C+D =  $10 \mu\text{m}$ )

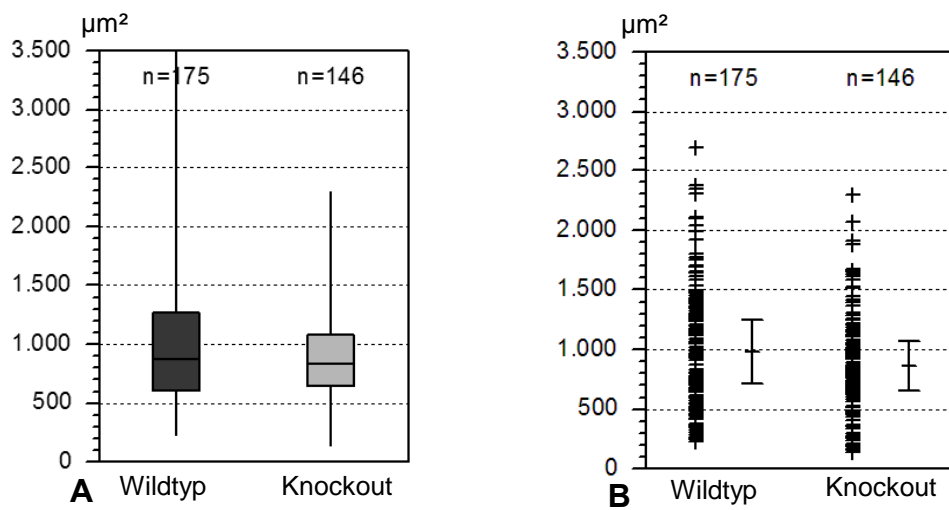


**Abb. 8: Histopathologie des Musculus quadriceps femoris im Alter von 12 Wochen (Kunstharzeinbettung, Längsschnitte bei 1  $\mu\text{m}$ ). In der PARL-defizienten Muskulatur liegen vereinzelt schlanke Fasern mit abgerundeten, zentral liegenden Kernen vor. (Maßstab in A+B = 30  $\mu\text{m}$ )**

Lichtmikroskopisch bietet der M. quadriceps femoris keine besonderen Auffälligkeiten. Die Muskelquerschnitte PARL-defizienter Mäuse zeigen vereinzelt basophile Tüpfelungen und eine aufgelockerte Fasernordnung (Abb. 7). Die lichtmikroskopisch bereits sichtbare Faserauflockerung entspricht möglicherweise den elektronenmikroskopisch sichtbaren Mitochondriengaps (Abb. 13).

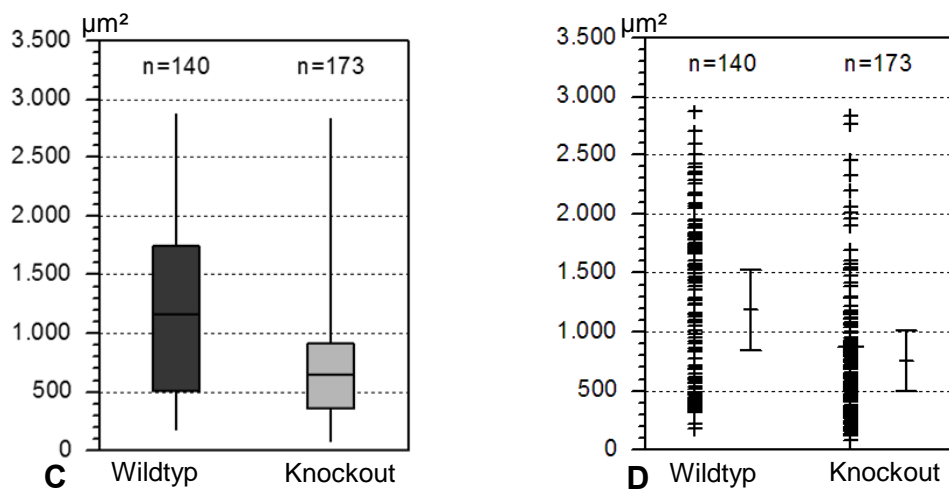
In den Längsschnitten PARL-defizienter Muskulatur fallen einzelne schlanke Fasern mit teils abgerundeten, zentral liegenden Kernen auf (Abb. 8b). Die Veränderungen sind inkonstant ausgeprägt. Die Mehrzahl der Muskelfasern zeigen keine auffälligen pathologischen Veränderungen mit einer physiologischen Kernmorphologie, -anordnung und Faserquerstreifung.

- **Bauchwandmuskulatur**



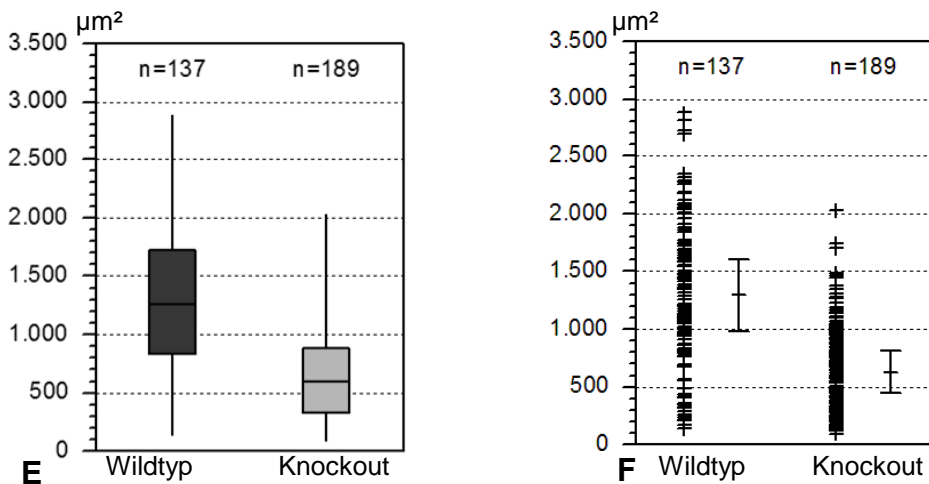
**Abb. 9 A+B:** 4 Wochen alte Mäuse

**Wildtyp:**  $\bar{X}$  981  $\pm$  40,4  $\mu\text{m}^2$ ; **Knockout:**  $\bar{X}$  864  $\pm$  33,9  $\mu\text{m}^2$



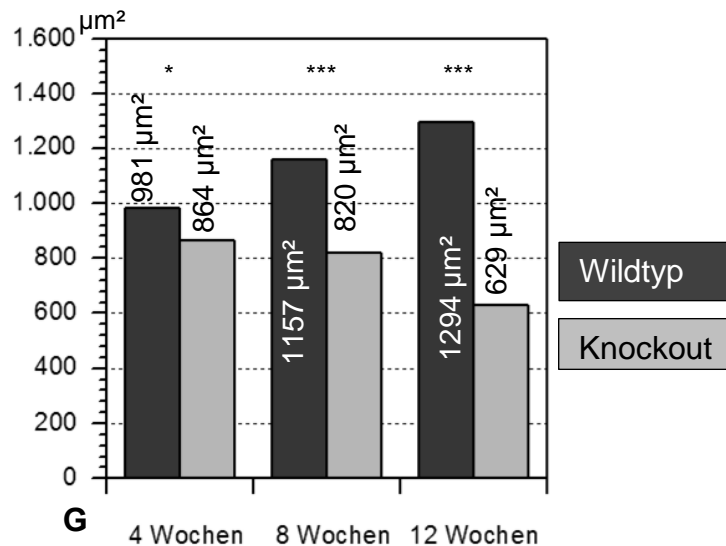
**Abb.9 C+D:** 8 Wochen alte Mäuse

**Wildtyp:**  $\bar{X}$  1157  $\pm$  57,3  $\mu\text{m}^2$ ; **Knockout:**  $\bar{X}$  820  $\pm$  35,7  $\mu\text{m}^2$



**Abb. 9 E+F:** 12 Wochen alte Mäuse

**Wildtyp:**  $\bar{x}$  1294  $\pm$  53,3  $\mu\text{m}^2$ ; **Knockout:**  $\bar{x}$  629  $\pm$  26,7  $\mu\text{m}^2$

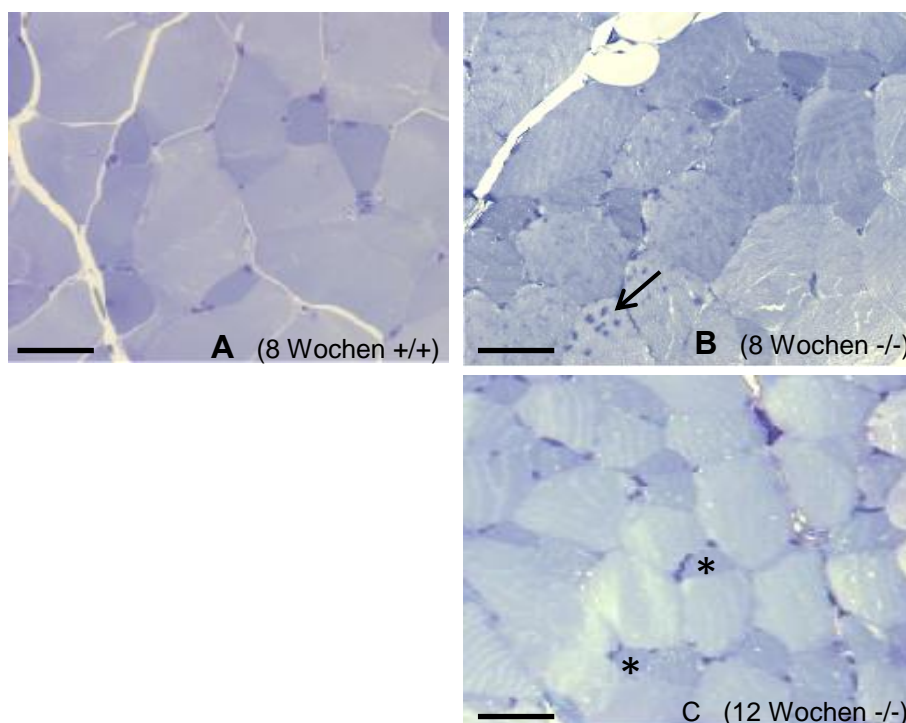


**Abb. 9g:** Die Querschnittsfläche der Bauchwandmuskulatur PARL-defizienter Mäuse ist bereits zum Zeitpunkt von 8 Wochen hoch signifikant gegenüber dem Wildtyp reduziert, bis zum Zeitpunkt von 12 Wochen hat sich eine Differenz von 50 % entwickelt ( $p < 0,0001$ ,\*\*\*;  $p < 0,1519$ ,\* - nicht signifikant (Erläuterung der Signifikanzgrenzen s. Methodenteil unter 3.2 „Statistische Auswertung der Muskelfaserquerschnittsflächen“)).

Die Wildtyp-Bauchwandmuskulatur zeigt einen linearen Muskelfaserquerschnittsflächenzuwachs im Verlauf von der 4. bis zur 12. Woche (Abb. 9g). Zu Beginn der Messreihe bei 4 Wochen zeigen die Wildtypen eine Fläche von 981  $\pm$  40,4  $\mu\text{m}^2$ , die Knockouts zeigen ein ähnliches Bild mit 864  $\pm$  33,9  $\mu\text{m}^2$  (Abb. 9a+b). Bis zur 8. Woche hat sich die Wildtyp-Muskelfaserquerschnittsfläche vergrößert und die der PARL-defizienten Mäuse verringert. Bei der Berechnung des Signifikanzniveaus mittels des

Mann-Whitney Tests (Erläuterung zur statistischen Auswertung s. Methodenteil unter 3.2) ergab sich ab der 8. Woche eine signifikante Muskelfaserquerschnittsflächen-differenz zwischen Wildtyp und Knockout (s. Abb. 9g). Die durchschnittliche Wildtyp-Muskelfaserquerschnittsfläche beträgt zu diesem Zeitpunkt  $1157 \pm 57,3 \mu\text{m}^2$  und die der Knockout-Mäuse  $820 \pm 35,7 \mu\text{m}^2$  (Abb. 9c+d). Bis zur 12. Woche hat sich eine deutliche Querschnittsflächendifferenz zwischen Wildtyp und Knockout abgezeichnet: Bei den Wildtypen liegt die Fläche bei  $1294 \pm 53,3 \mu\text{m}^2$ , wohingegen die Knockouts mit  $629 \pm 26,7 \mu\text{m}^2$  eine deutlich reduzierte Flächengröße gegenüber den Wildtyp-Tieren entwickelt haben (Abb. 9e+f).

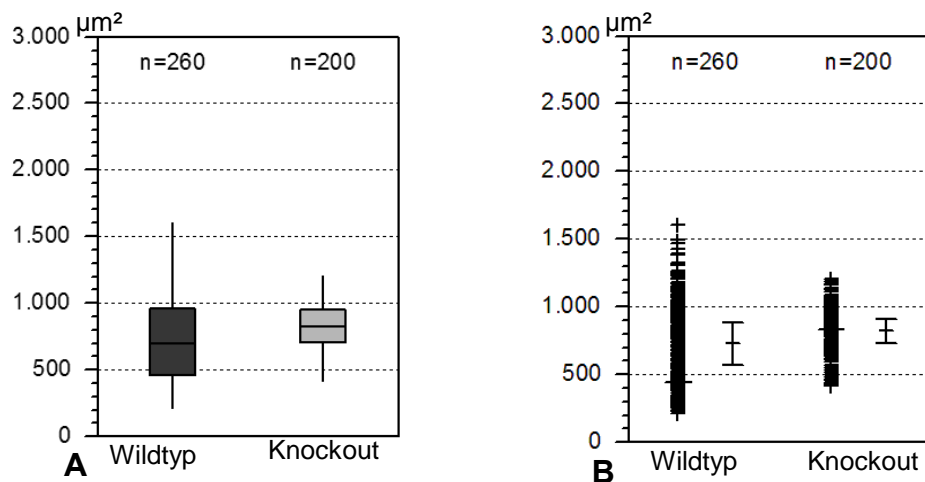
Die Streuung der Wildtyp-Tiere übersteigt zu allen drei Messpunkten die der Knockouts (Abb. 9 b+d+f) mit einer maximalen Streuweite zum Zeitpunkt von 8 Wochen (Abb. 9d). Am Anfang der Messreihe bei 4 Wochen liegt die Streuung der Wildtyp-Muskulatur geringgradig über der der Knockouts (Abb. 9b). Die Knockouts zeigen zu allen drei Zeitpunkten ähnliche Streuungsmaße mit einem Maximum zum Zeitpunkt von 8 Wochen (Abb. 9d).



**Abb. 10: Histopathologie der Bauchwandmuskulatur (Kunstharzeinbettung, Semidünnschnitt bei  $1 \mu\text{m}$ ). Der Pfeil markiert eine in der PARL-defizienten Muskulatur vorliegende basophile Tüpfelung. Die Sternchen markieren Muskelfasern mit deutlicher Flächenreduktion zum Zeitpunkt von 12 Wochen. (Maßstab in A+B =  $50 \mu\text{m}$ , C =  $30 \mu\text{m}$ )**

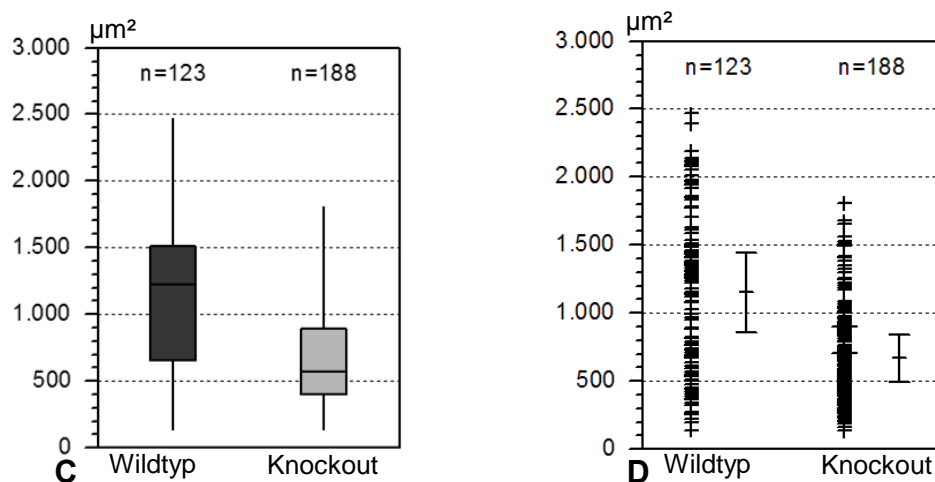
Die PARL-defiziente-Bauchwandmuskulatur zeigt lichtmikroskopisch nur gering ausgeprägte Differenzen gegenüber dem Wildtyp. Ab der 8. Woche fällt eine basophile Tüpfelung der PARL-defizienten-Muskulatur auf (Abb. 10b). Deutlich zu erkennen ist zudem der Muskelfaserquerschnittsflächenverlust einzelner Muskelfasern im Alter von 12 Wochen (Abb. 10c).

- **Musculus tibialis anterior**



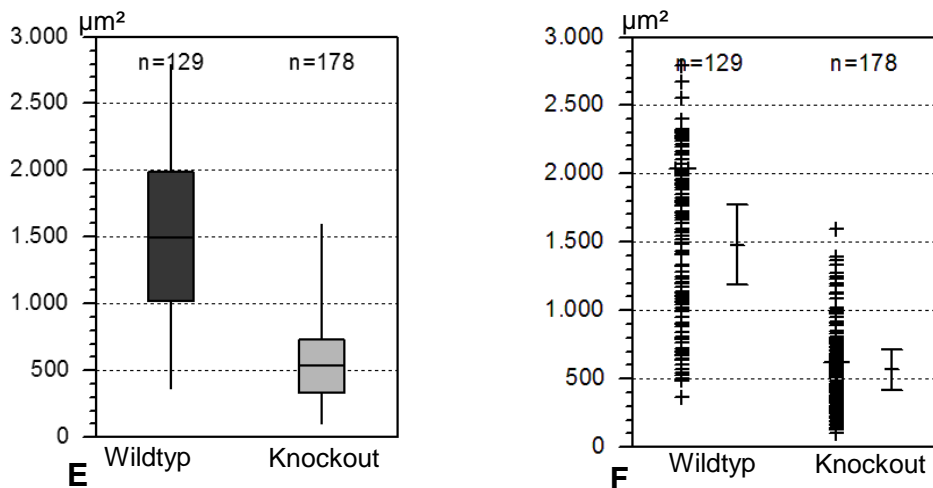
**Abb. 11 a+b:** 4 Wochen alte Mäuse

**Wildtyp:**  $\bar{x}$  727  $\pm$  19,4  $\mu\text{m}^2$ ; **Knockout:**  $\bar{x}$  819  $\pm$  12,1  $\mu\text{m}^2$



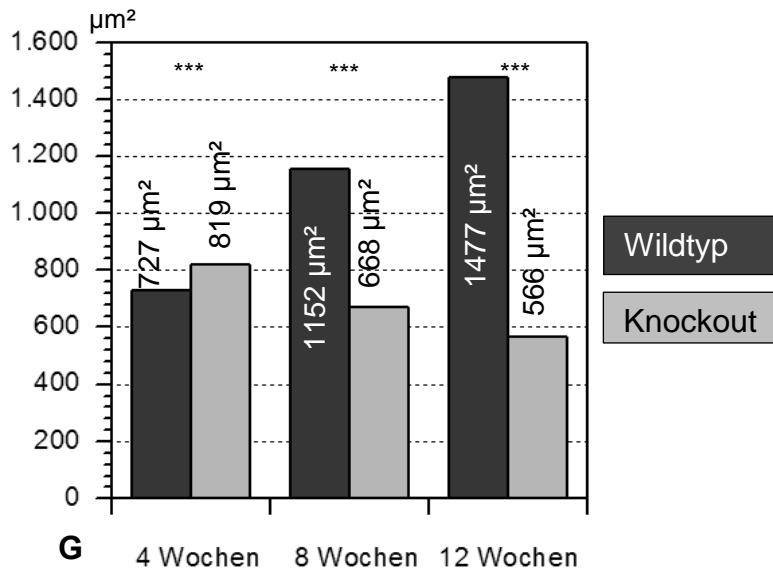
**Abb. 11 c+d:** 8 Wochen alte Mäuse

**Wildtyp:**  $\bar{x}$  1152  $\pm$  52,8  $\mu\text{m}^2$ ; **Knockout:**  $\bar{x}$  668  $\pm$  25,6  $\mu\text{m}^2$



**Abb. 11 e+f:** 12 Wochen alte Mäuse

**Wildtyp:**  $\bar{O}$  1477  $\pm$  51,5  $\mu\text{m}^2$ ; **Knockout:**  $\bar{O}$  566  $\pm$  22,5  $\mu\text{m}^2$



**Abb. 11g:** Die Muskelfaserquerschnittsfläche des Musculus tibialis anterior steigt bei den Wildtyp-Mäusen linear an, wohingegen sich bei den Knockout-Tieren ein linearer Abfall abzeichnet. Zu allen drei Zeitpunkten liegt eine hoch signifikante Muskelfaserquerschnittsflächendifferenz vor. Jedoch ist zu beachten, dass zum Zeitpunkt von 4 Wochen die Muskelfaserquerschnittsfläche der Knockout-Tiere signifikant größer ist als die der Wildtyp-Tiere, somit ist erst ab der achten Woche die Muskelfaserquerschnittsfläche der Knockout-Mäuse gegenüber derer der Wildtyp-Tiere signifikant reduziert ( $p < 0,0001$ , \*\*\* (Erläuterung der Signifikanzgrenzen s. Methodenteil unter 3.2 „Statistische Auswertung der Muskelfaserquerschnittsflächen“)).

Die Muskelfaserquerschnittsfläche des M. tibialis anterior steigt bei den Wildtyp-Mäusen linear an, wohingegen sich bei den Knockout-Tieren ein linearer Abfall abzeichnet. Bereits zum Zeitpunkt von 8 Wochen liegt eine signifikant verringerte Muskelfaser-



querschnittsfläche beim Knockout gegenüber dem Wildtyp vor (Abb. 11g; Erläuterung zur statistischen Auswertung s. Methodenteil unter 3.2). Wie Abb. 11a+b zeigen, beträgt die Querschnittsfläche der Wildtyp-Mäuse bis zur 4. Woche  $727 \pm 19,4 \mu\text{m}^2$  gegenüber  $819 \pm 12,1 \mu\text{m}^2$  bei den PARL-defizienten Mäusen. Zum Zeitpunkt von 8 Wochen liegt eine relative Größendifferenz von 40 % mit einer Flächengröße bei den Wildtypen von  $1152 \pm 52,8 \mu\text{m}^2$  gegenüber  $668 \pm 25,6 \mu\text{m}^2$  bei den Knockouts vor (Abb. 11c+d). Bis zur 12. Woche übersteigt die Querschnittsfläche der Wildtyp-Tiere mit  $1477 \pm 51,5 \mu\text{m}^2$  die der Knockout-Tiere mit  $566 \pm 22,5 \mu\text{m}^2$  um 60 % (Abb. 11e+f).

Die geringste Streuung der Muskelzellgröße zeigen sowohl die Wildtypen als auch die Knockouts zum Zeitpunkt von 4 Wochen, wobei die Streuung der Wildtypen höher liegt als die der Knockouts. Von der 4. bis zur 8. Woche steigt die Streuung bei beiden Genotypen um mehr als das Doppelte an; die Streuung liegt im Alter von 8 Wochen bei den Wildtyp-Mäusen doppelt so hoch wie bei den Knockout-Tieren. Bis zur 12. Woche ist die Streuung sowohl für die PARL-defiziente Muskulatur als auch für die Wildtyp-Muskulatur gering gesunken.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die bei 12 Wochen alten Tieren beobachtete Differenz in den Muskelfaserquerschnitten vorwiegend auf einen Abfall der Faserquerschnittsfläche nach der 4. postnatalen Woche zurückzuführen ist.

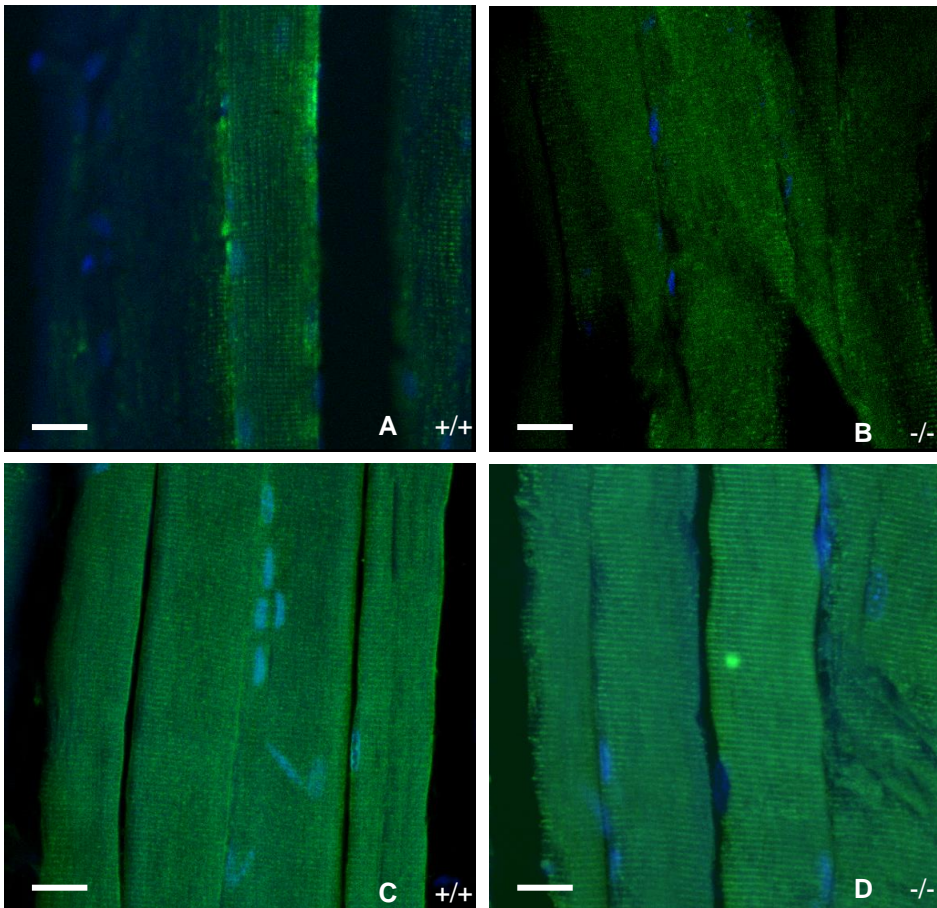
Für den M. tibialis anterior, den M. quadriceps femoris und die Bauchwandmuskulatur liegt zum Zeitpunkt von 8 Wochen eine signifikant verringerte Muskelfaserquerschnittsfläche bei den PARL-Knockout Mäusen gegenüber dem Wildtyp vor; beim M. biceps brachii ist bereits um die 4. Woche eine signifikant verringerte Muskelfaserquerschnittsfläche beim Knockout gegenüber dem Wildtyp zu verzeichnen (Berechnung der Signifikanz mittels des Mann-Whitney Tests (s. Methodenteil unter 3.2 „Statistische Auswertung der Muskelfaserquerschnittsflächen“); Signifikanzniveaus s. Abb. 5g, 6g, 9g, 11g). Überraschenderweise zeigt die PARL-defiziente Muskulatur lichtmikroskopisch nur geringe qualitative Veränderungen gegenüber der Wildtyp-Muskulatur (Abb. 7+8+10).

Bis zur 12. Woche zeigt sich bei allen untersuchten Muskeln eine Flächenreduktion des Knockouts gegenüber dem Wildtyp von 50 %. Die absoluten Werte der hier gemessenen Muskelfaserquerschnitte stimmen gut überein mit den von anderen

Arbeitsgruppen publizierten Daten (z. B. McCarthy et al., 2011). Der Verlauf der Querschnittsflächenreduktion bei den Knockout-Muskelproben ist jedoch für die unterschiedlichen Muskeln different.

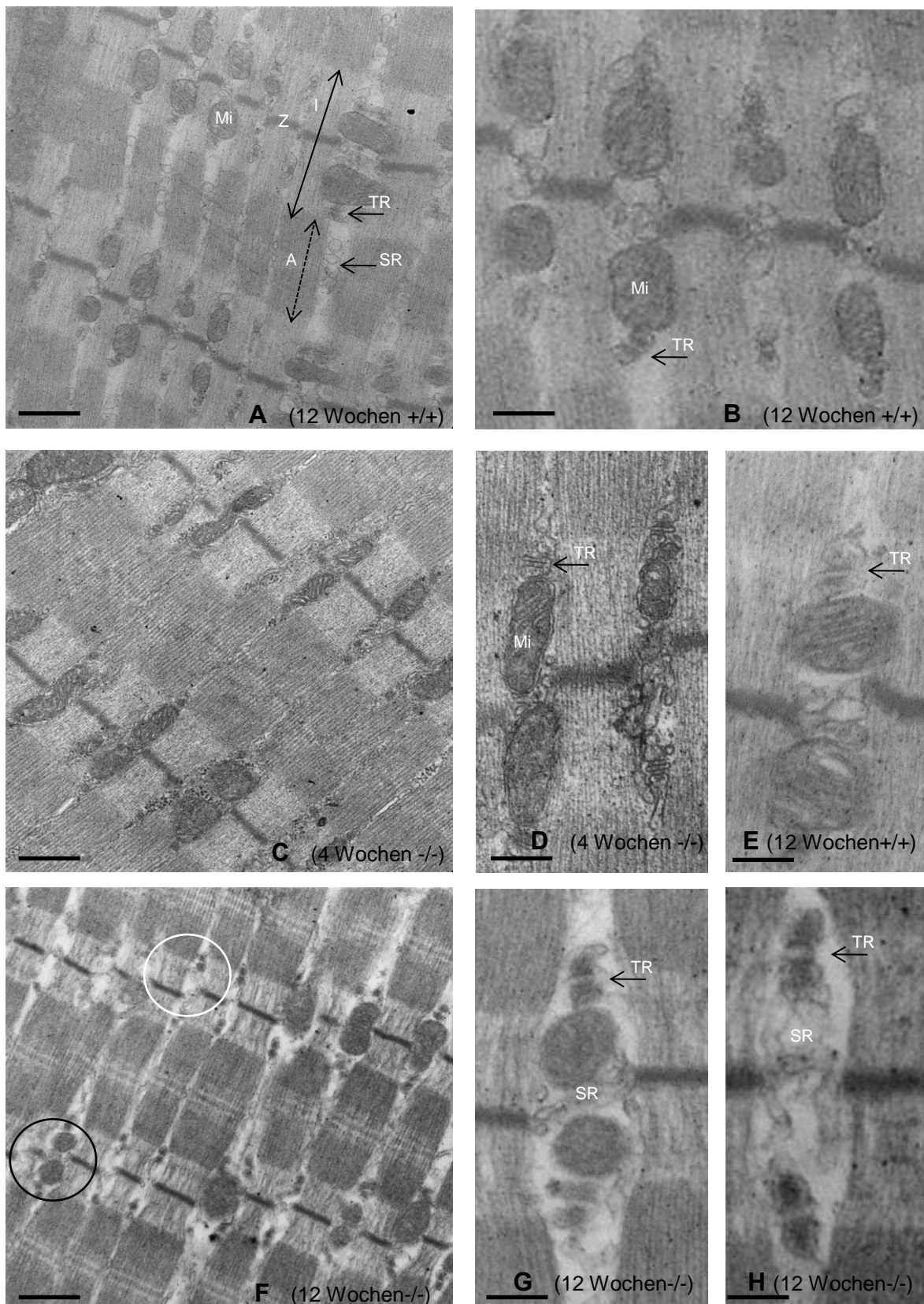
#### 4.2 Immunhistochemisch und ultrastrukturell präsentieren sich Mitochondrien und das assoziierte sarkoplasmatische Retikulum ohne große Auffälligkeiten

Die immunhistochemische Untersuchung der Mitochondrienverteilung im M. quadriceps femoris von 12 Wochen alten Mäusen erfolgte anhand der Mitochondrienmarker Aconitase 2 (Abb. 12a+b) und Murf 1 (Abb.12c+d).



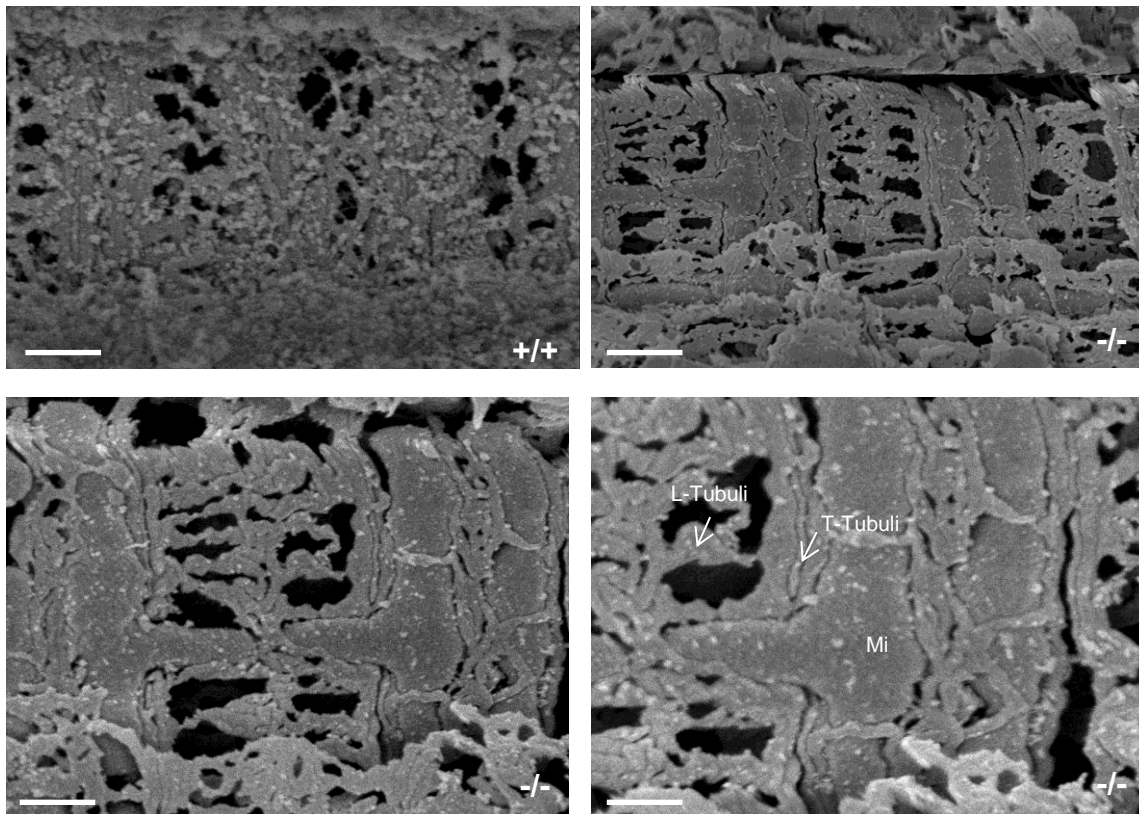
**Abb. 12: Anhand der Mitochondrienmarker Aconitase 2 und Murf 1 ist eine unveränderte Mitochondrienanordnung in PARL-defizienter Muskulatur zu detektieren.** (Maßstab A-D = 10 µm)

Immunhistochemisch ist in der PARL-defizienten Muskulatur eine gegenüber dem Wildtyp unveränderte Anordnung der Mitochondrien nachweisbar (Abb.12).



**Abb. 13: Ultrastruktur von Mitochondrium und assoziiertem sarkoplasmatischem Retikulum in Wildtyp und PARL-defizienter Skelettmuskulatur (Musculus quadriceps femoris)** (Maßstab in A+C = 500 nm, B+D+E+G+H = 250 nm, F = 700 nm)

Die Muskulatur PARL-defizienter Mäuse zeigt die charakteristische Topographie von Mitochondrien zwischen SR auf Höhe der I-Bande, eng verbunden mit den Triaden der T-Tubuli und den terminalen SR-Zisternen, die auf Höhe des A/I-Übergangs liegen (Abb. 13g+h). Vom Beginn der pathomorphologischen Entwicklung im Alter von 4 Wochen bis nahe des Todeszeitpunktes von 12 Wochen ist die Mitochondrienmorphologie und Topographie in Relation zu den Triaden physiologisch. Neben komplett physiologischen SR/Mitochondrien-Komplexen fallen lediglich im Alter von 12 Wochen vereinzelt Fasern mit weniger Mitochondrien auf (Abb. 13f). Die durch das Fehlen von Mitochondrien entstandenen Lücken zwischen dem SR werden durch schlauchförmige L-Tubuli des SRs gefüllt.

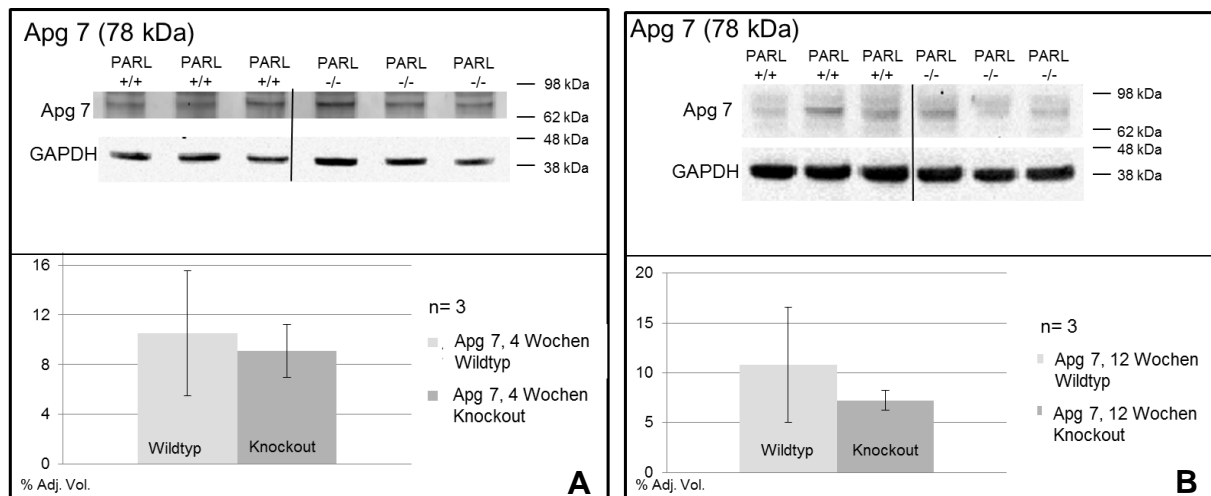


**Abb. 14:** Die rasterelektronenmikroskopische Oberflächendarstellung von Mitochondrium zum sarkoplasmatischen Retikulum ist in PARL-defizienter Muskulatur unverändert. (Maßstab in A+B = 500 nm, C+D = 250 nm)

Rasterelektronenmikroskopisch präsentiert sich die topographische Interaktion zwischen Mitochondrium und glattem ER in PARL-defizienter Muskulatur selbst im Alter von 12 Wochen unverändert (Abb. 14). L- und T-Tubuli zeigen eine regelrechte Form mit einer topographisch physiologischen Anordnung von Mitochondrium zum SR.

### 4.3 PARL-defiziente Mäuse zeigen keine deutliche Proteinexpressionsdifferenz des Autophagiemarkers Apg 7

Apg 7 ist ein Autophagiemarker, der insbesondere in der Skelettmuskulatur eine Rolle spielt. Zwei Substrate von PARL PINK1 und Parkin sind für die Erhaltung der mitochondrialen Integrität verantwortlich (Exner et al., 2007; Poole et al., 2008; Yang et al., 2008); daher wäre beim Ausfall deren Prozessierung durch PARL eine Störung des mitochondrialen Abbaus denkbar.

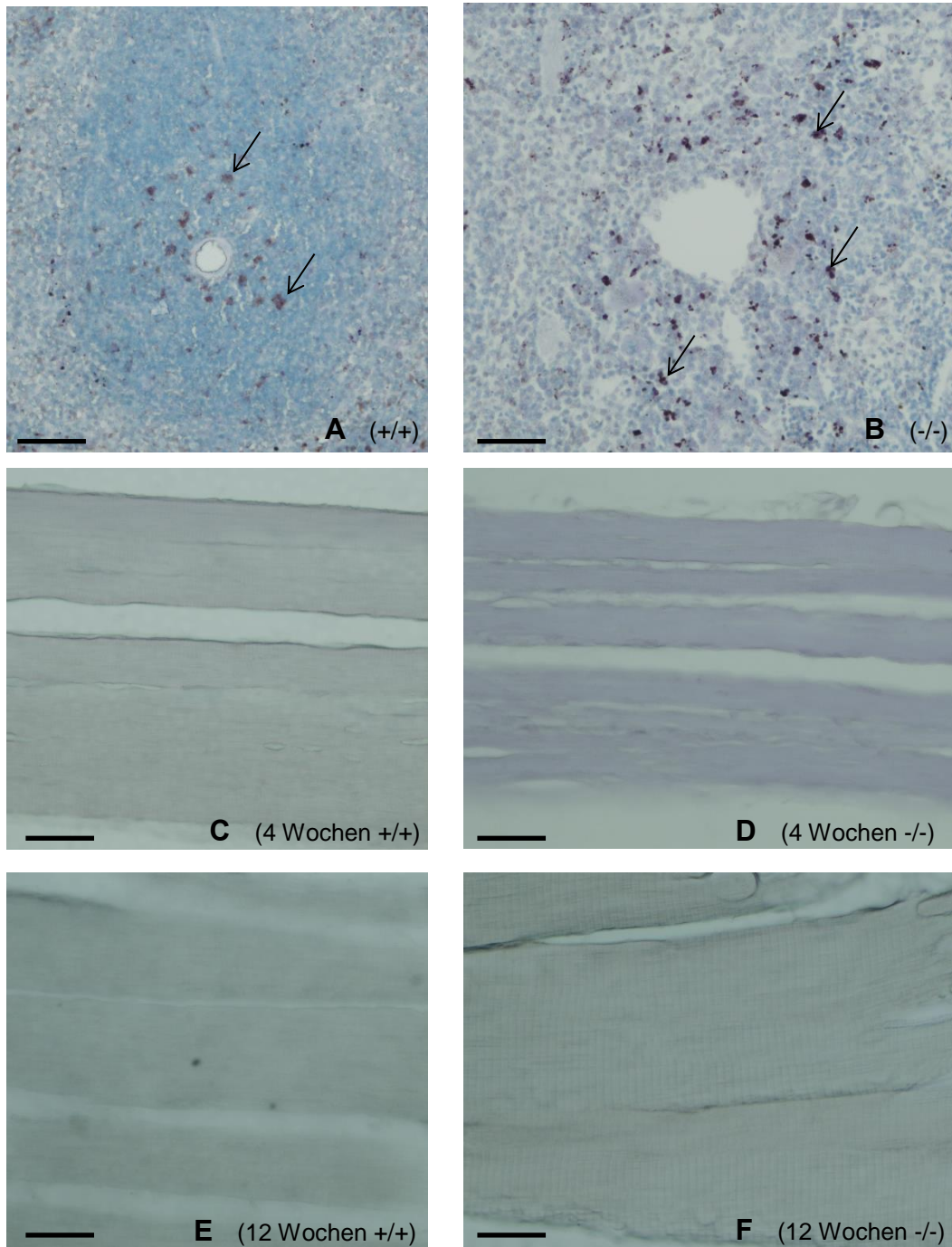


**Abb. 15: Vergleich der Proteinexpression von Apg 7 im Musculus quadriceps femoris bei Wildtyp- und PARL-defizienten Mäusen im Alter von 4 Wochen (A) und 12 Wochen (B)**

Bei der Proteinexpressionsanalyse PARL-defizienter Muskelproben aus 4 Wochen alten Mäusen ist kein deutlicher Expressionsunterschied von Apg 7 gegenüber der Wildtyp-Muskulatur ersichtlich (Abb. 15a). Die Muskelproben von 12 Wochen alten Knockout-Tieren weisen hingegen eine um etwa  $\frac{1}{3}$  verringerte Proteinexpression auf (Abb. 15b). Weder morphologisch noch biochemisch gibt es in der Muskulatur PARL-defizienter Mäuse Hinweise auf das Vorliegen von dysfunktionaler Autophagie.



#### 4.4 PARL-defiziente Muskulatur gibt keinen Anhalt für das Vorliegen von erhöhter Aktivierung der Apoptose-Signalwege



**Abb. 16: TUNEL-Testung an der Milz (A+B) und am Musculus quadriceps femoris (C-F)** (Maßstab in A = 100  $\mu$ m, B = 70  $\mu$ m, C+D = 50  $\mu$ m, E+F = 25  $\mu$ m)

Anhand des TUNEL Assays an Muskelproben sollte untersucht werden, ob die Endphase der Apoptose bei PARL-defizienten Mäusen vermehrt aktiviert ist. Dabei

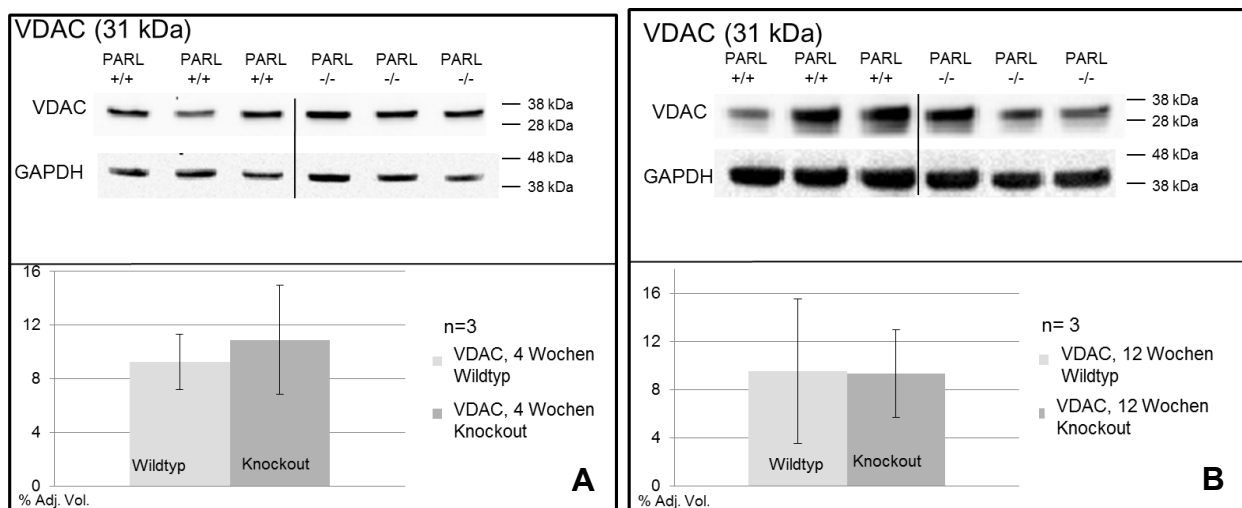
werden die in der Endphase der Apoptose entstehenden DNA-Fragmente durch eine lokalisierte, schwarze Färbung sichtbar gemacht.

In der Milz PARL-defizienter Mäuse fallen bei der TUNEL-Testung gegenüber der Wildtyp-Milz vermehrt apoptotische Zellen auf (Abb. 16a+b).

Weder zu Beginn der pathomorphologischen Veränderungen im Alter von 4 Wochen (Abb. 16c+d) noch nahe des Todeszeitpunkts im Alter von 12 Wochen (Abb. 16e+f) lassen sich apoptotische Zellen in der PARL-defizienten Muskulatur detektieren.

Neben der TUNEL-Testung sollte anhand eines Proteins, das an der in der Endphase der Apoptose ablaufenden Cytochrom c-Freisetzung beteiligt ist, das Vorliegen von Apoptose in Muskelschnitten getestet werden.

VDAC sind Proteine der äußeren Mitochondrienmembran und bilden Porin-Kanäle, die als Diffusionspore für hydrophile Moleküle dienen. VDAC-Kanäle haben eine regulatorische Funktion im Apoptose-Signalweg, indem sie Cytochrom c aus dem Mitochondrium freisetzen. Die Untersuchung der Proteinexpression dient dem Nachweis, ob die Endphase der Apoptose –die Cytochrom c-Freisetzung– durch PARL-Defizienz beeinflusst wird.



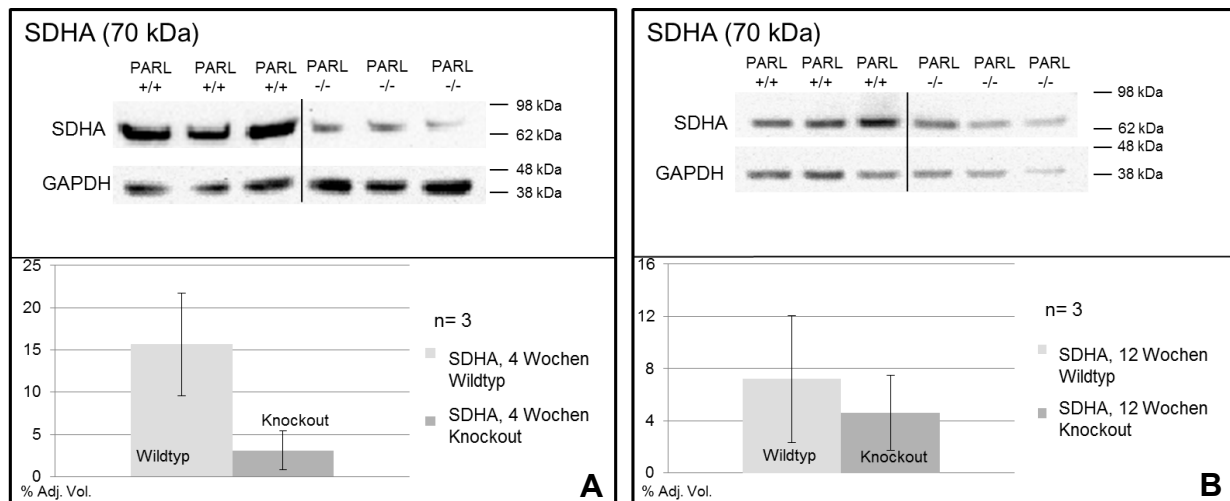
**Abb. 17: Vergleich der Proteinexpression von VDAC im Musculus quadriceps femoris bei Wildtyp- und PARL-defizienten Mäusen im Alter von 4 Wochen (A) und 12 Wochen (B)**

Sowohl die Muskelproben von 4 Wochen als auch von 12 Wochen alten Mäusen zeigen keine deutlichen Proteinexpressionsdifferenzen von VDAC (Abb. 17a+b); die Proteinexpression im Alter von 12 Wochen ist sogar nahezu identisch.

Sowohl der TUNEL-Test als auch die Ergebnisse der Proteinexpression von VDAC geben keinen Anhalt für das Vorliegen einer verstärkten Aktivierung der Endphase der Apoptose.

#### 4.5 PARL-Defizienz beeinflusst die Proteinexpression von Atmungskettenenzymkomplexen

##### 4.5.1 PARL-defiziente Muskulatur weist eine verringerte Proteinexpression von SDHA auf



**Abb. 18: Vergleich der Proteinexpression von SDHA im Musculus quadriceps femoris bei Wildtyp- und PARL-defizienten Mäusen im Alter von 4 Wochen (A) und 12 Wochen (B)**

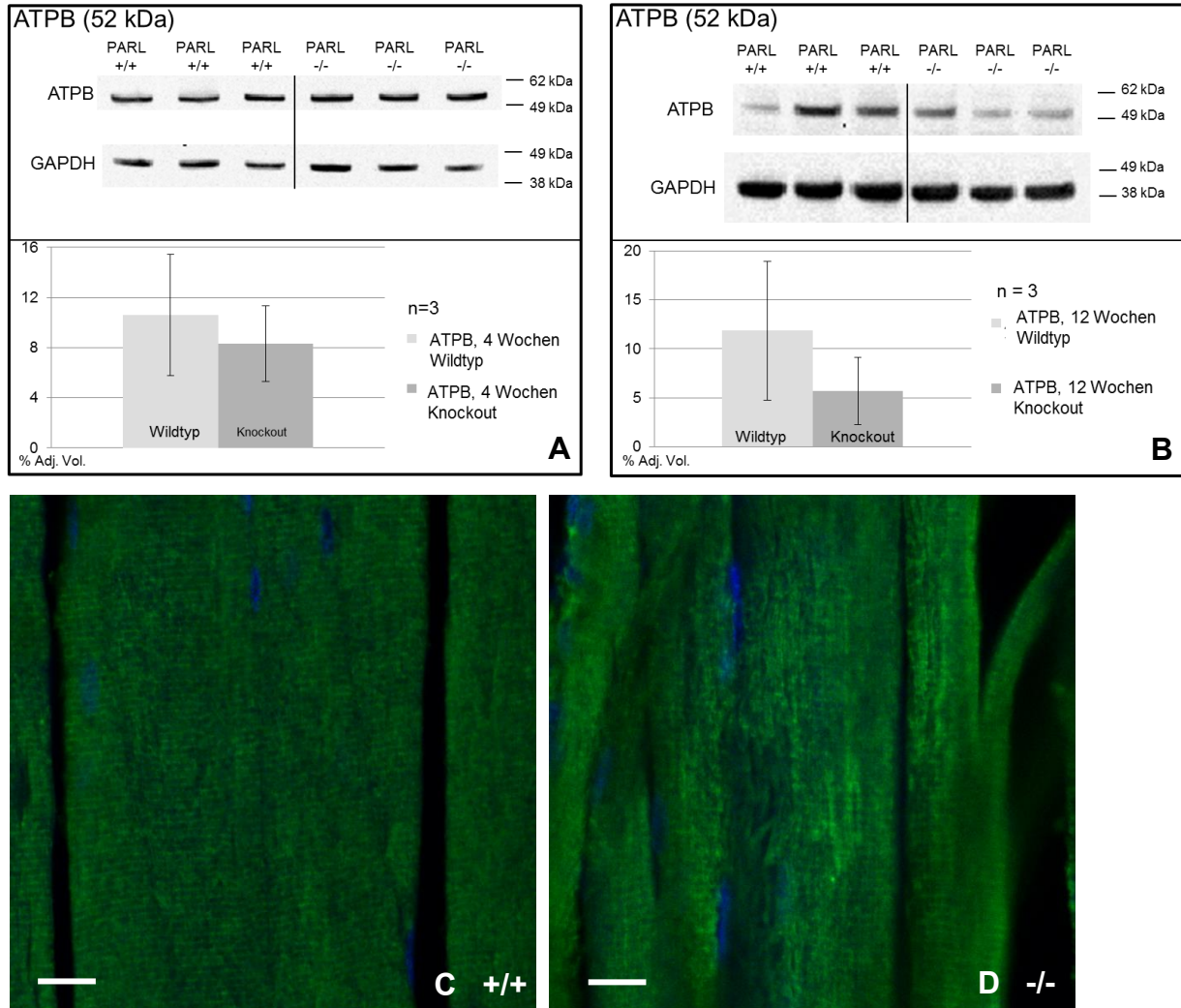
Die Untersuchung der Proteinexpression von SDHA, einem Bestandteil des mitochondrial gelegenen Komplex II, der Succinate-Ubiquinol-Oxidoreduktase, zeigt deutliche Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Muskulatur. Die Proteinexpression von SDHA ist bei 4 Wochen alten PARL-defizienten Mäusen um  $\frac{3}{4}$  reduziert (Abb. 18a).

Bei Muskelproben von 12 Wochen alten Mäusen ist genauso wie bei 4 Wochen alten Muskelproben eine Differenz in der Proteinexpression von SDHA zwischen Wildtyp und Knockout detektierbar; hier ist die Proteinexpression des Knockouts um etwa  $\frac{1}{3}$  gegenüber dem Wildtyp reduziert (Abb. 18b). Somit lässt sich sowohl eine Proteinexpressionsreduktion im Muskel bei 4 Wochen als auch bei 12 Wochen alten Tieren



konstatieren, wobei die Differenz im Alter von 4 Wochen deutlich ausgeprägter ist als im Alter von 12 Wochen.

#### 4.5.2 Die Proteinexpression von ATPB ist in PARL-defizienter Muskulatur verringert

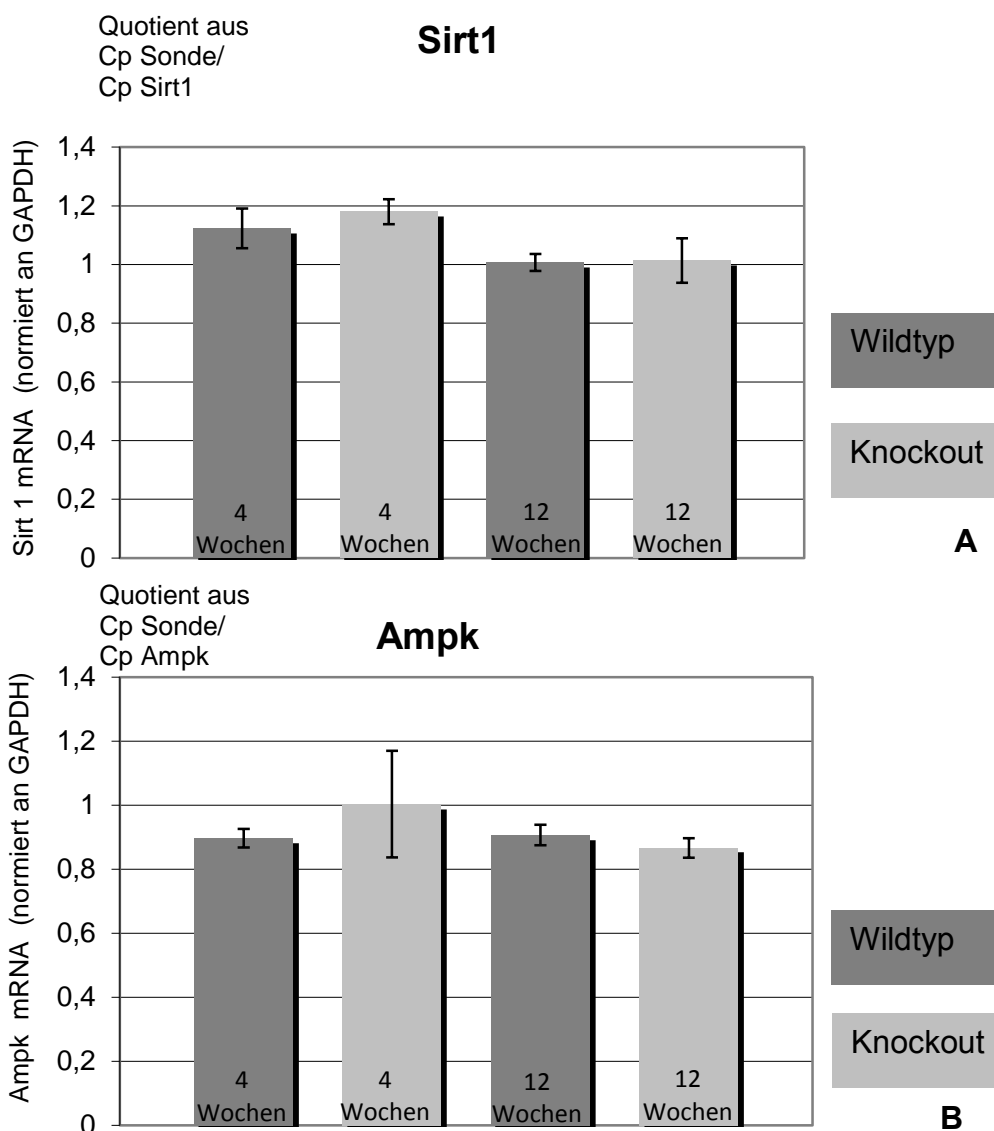


**Abb. 19: Vergleich der Proteinexpression von ATPB im Musculus quadriceps femoris bei Wildtyp- und PARL-defizienten Mäusen im Alter von 4 Wochen (A) und 12 Wochen (B) und deren unveränderte fluoreszenzmikroskopische Darstellung im Alter von 12 Wochen (C+D)**

ATPB bildet die  $\beta$ -Untereinheit des F<sub>1</sub>-Komplexes der ATP-Synthase. Im Alter von 4 Wochen zeigen die PARL-defizienten Mäuse eine nur sehr schwach verringerte Proteinexpression von ATPB gegenüber dem Wildtyp (Abb. 19a). Bis zum Alter von 12 Wochen hat sich die Proteinexpression allerdings gegenüber dem Wildtyp halbiert (Abb. 19b). Fluoreszenzmikroskopisch lässt sich kein qualitativer Unterschied von ATPB zwischen Wildtyp- und PARL-defizienter Muskulatur nachweisen (Abb. 19c+d).

#### 4.6.1 Sirt1 und Ampk zeigen auf Genebene keine Differenzen zwischen Wildtyp- und PARL-defizienter Muskulatur

Da die Hauptfunktion der Atmungskette die Energieproduktion in Form von ATP ist, würde man bei einem Atmungskettendefekt ein Energiedefizit erwarten. Daher sollte im Weiteren getestet werden, ob die in der PARL-defizienten Muskulatur vorliegende verringerte Proteinexpression des Atmungskettenenzymkomplexes SDHA und der  $\beta$ -Untereinheit des F1-Komplexes der ATP-Synthase typische gegenregulatorische Mechanismen bei Vorliegen eines Energiedefizits aufzeigt.



**Abb. 20: Analyse der Expression von Sirt1 (A) und Ampk (B)** (Erläuterungen zur „Auswertung der qPCR Ergebnisse“ s. 3.6 im Methodenteil)

Der Vergleich der mRNA-Expression des „Energiesensors“ Sirt1 in 4 Wochen und 12 Wochen alten Muskelproben ist in Abb. 20a dargestellt.

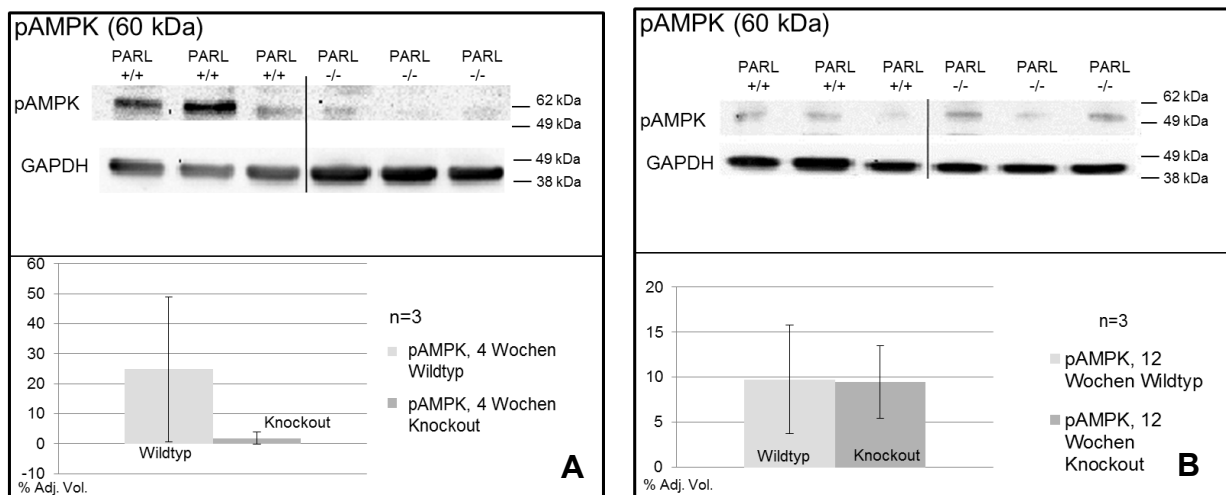
Der prozentuale Vergleich der Mittelwerte aus den Quotienten der Crossing points der Muskelproben von 4 Wochen alten Mäusen (Säule 1 und 2) liegt bei 4,8 %, die von Muskelproben von 12 Wochen alten Mäusen (Säule 3 und 4) liegt unter 1 %.

Das Diagramm Abb. 20b stellt den Vergleich der mRNA-Expression eines zweiten Energiesensors Ampk, einer metabolischen Stress-Sensor-Proteinkinase, in 4 Wochen und 12 Wochen alten Muskelproben dar.

Vergleicht man für den Energiesensor Ampk die Mittelwerte der Quotienten aus den Crossing points der Muskelproben von 4 Wochen alten Mäusen zwischen Wildtyp und Knockout (Säule 1 und 2), so beträgt die prozentuale Differenz etwa 10 %, die von Muskelproben von 12 Wochen alten Mäusen (Säule 3 und 4) etwa 4,4 %.

Nach Normalisierung gegenüber der mRNA-Expression des Referenzgens GAPDH zeigt der Vergleich der Expression von AMPK zwischen PARL Wildtyp- und Knockout-Mäusen nur geringe Differenzen.

#### 4.6.2 In PARL-defizienter Muskulatur ist die Aktivierung von AMPK zu pAMPK transient reduziert



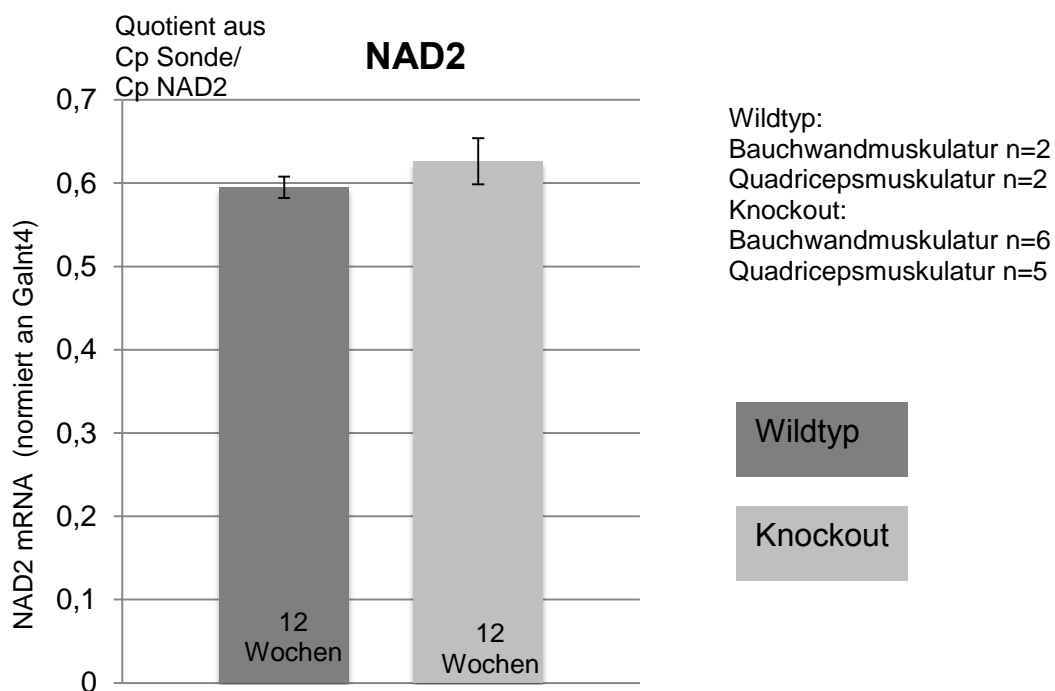
**Abb. 21: Analyse des post-translational phosphorylierten Anteils von Ampk (A+B)**

Der Wildtyp-Knockout-Vergleich von 4 Wochen alten Mäusen zeigt bei den Knockout-Muskelproben eine deutlich verringerte Konversion des Energiesensors Ampk zur post-translational phosphorylierten Form (Abb. 21a). Die Muskelproben von 12 Wochen alten Mäusen weisen hingegen keine große Differenz zwischen Wildtyp und Knockout auf

(Abb. 21b). Bei einem Energiedefizit wäre als Kompensationsmechanismus eine erhöhte posttranslationale Phosphorylierung des Energiesensors Ampk zu erwarten.

#### 4.7 Die mtDNA/ nDNA Ratio ist in PARL-defizienter Skelettmuskulatur im Alter von 12 Wochen unverändert

Da SDH neben seiner Funktion als Elektronentransporter der Atmungskette noch als Antioxidans fungiert (Ernster et al., 1995), sollte getestet werden, ob eine mögliche erhöhte Konzentration an Superoxiden eine Schädigung der mtDNA bedingt. Dafür wurde die mtDNA/nDNA Ratio bestimmt.

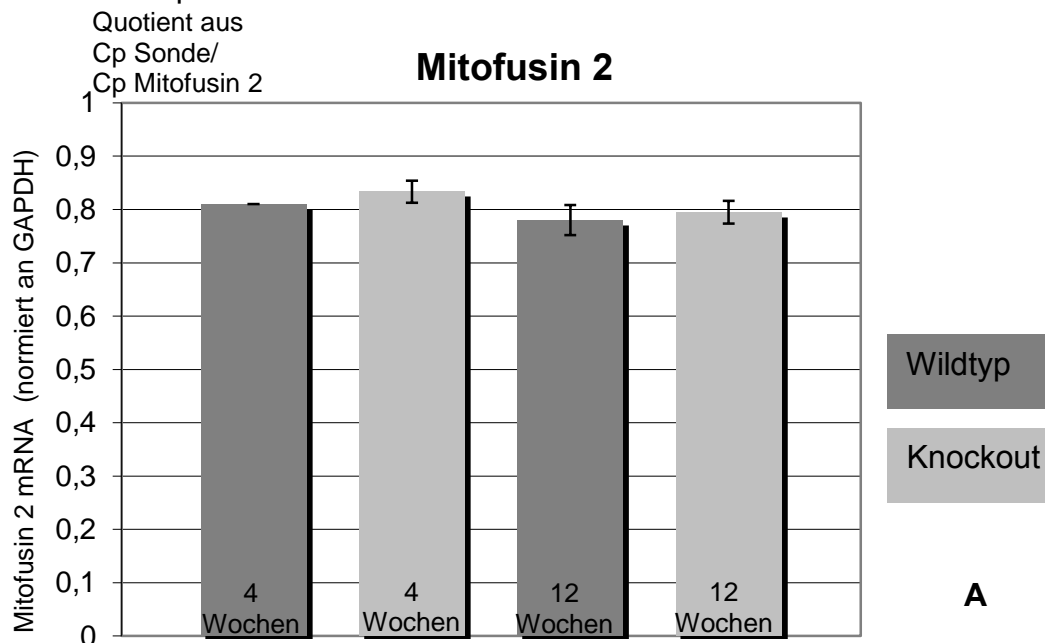


**Abb. 22: Analyse der mtDNA/ nDNA Ratio im Musculus quadriceps femoris bei Wildtyp- und PARL-defizienten Mäusen im Alter von 12 Wochen**

Die mtDNA/nDNA Ratio in PARL-defizienter Muskulatur und Wildtyp-Muskulatur sind in Abb. 22 dargestellt (Erläuterungen zur „Auswertung der qPCR Ergebnisse“ s. 3.6 im Methodenteil). Es wurde NAD2 als Markergen für die mtDNA und Galnt4 als Markergen für die nukleäre DNA eingesetzt, aus denen ein Quotient gebildet wurde. Die prozentuale Differenz der Mittelwerte der Quotienten aus den Crossing points der Muskelproben zwischen Wildtyp und Knockout von 12 Wochen alten Mäusen (Säule 1 und 2) liegt bei 5 %. Somit konnte kein Anhalt für mtDNA-Verlust bei PARL-defizienten Mäusen gefunden werden.

#### 4.8.1 PARL-defiziente Muskulatur weist eine unveränderte Genexpression von Mitofusin 2 auf

Neben dem detektierten Atmungskettendefekt sollte untersucht werden, ob PARL die Kopplung von Mitochondrien und ER beeinflusst, die u. a. für die Funktion von Mitochondrien als  $\text{Ca}^{2+}$ -Puffer zu fungieren eine Rolle spielt. An letzterer ist die Interaktion zwischen ER und Mitochondrium beteiligt (McQuibban et al., 2003; Herlan et al., 2003). Eine dysfunktionale Interaktion könnte über einen fehlregulierten Calciumspiegel zur Sarcopenie führen. Es wurden daher durch quantitative PCR die Expression der beteiligten Proteine (Mfn2, SERCA1 und SERCA2) und anhand von Western blots die Proteinexpression von Mitofusin 2 untersucht.



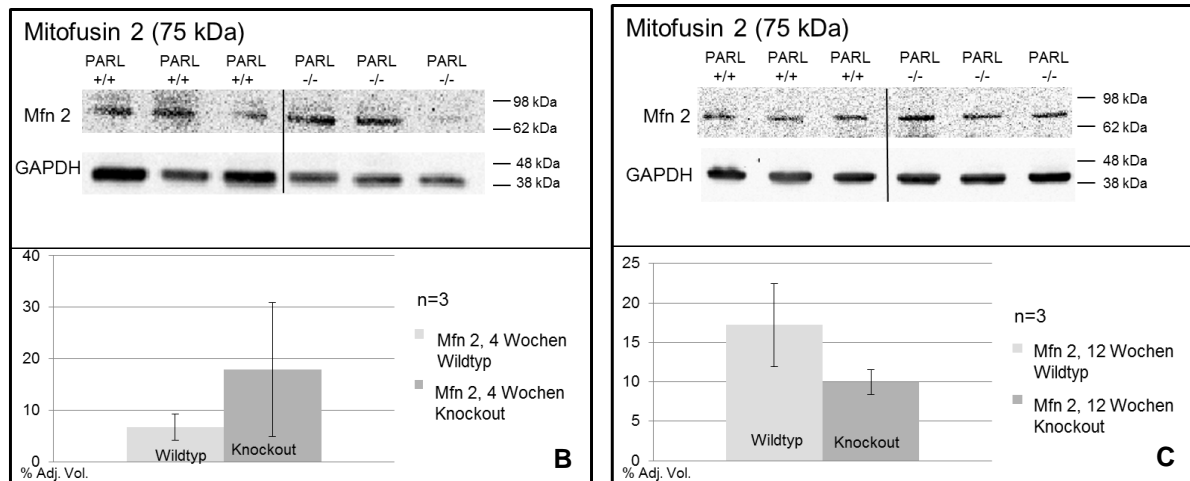
**Abb. 23a: Analyse der mRNA-Expression von Mitofusin 2 im Musculus quadriceps femoris**

Das Diagramm Abb. 23a stellt den Vergleich der mRNA-Expression des an der Mitochondrienfusion und an der ER-Mitochondrium-Interaktion beteiligten Proteins Mfn 2 in 4 Wochen und 12 Wochen alten Muskelproben dar (Erläuterungen zur „Auswertung der qPCR Ergebnisse“ s. 3.6 im Methodenteil). Die prozentuale Differenz der Mittelwerte der Quotienten aus den Crossing points der Muskelproben zwischen Wildtyp und Knockout von 4 Wochen alten Mäusen (Säule 1 und 2) liegt bei 2,8 %, die von Muskelproben von 12 Wochen alten Mäusen (Säule 3 und 4) bei 1,9 %.

Sowohl im Alter von 4 Wochen als auch im Alter von 12 Wochen lässt sich somit für Mfn 2 auf mRNA-Ebene in PARL-defizienter Muskulatur kein Verlust detektieren.

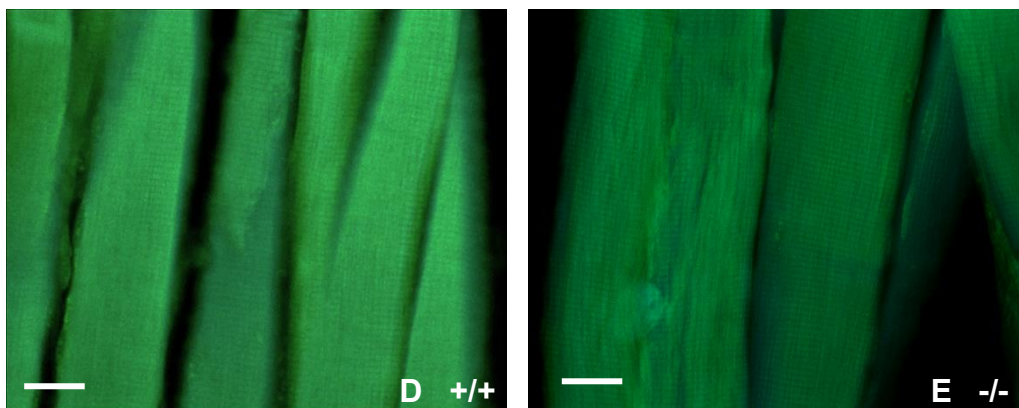
#### 4.8.2 Die Proteinexpression von Mitofusin 2 zeigt einen biphasischen Verlauf

Die Expression von Mitofusin 2 ist auf mRNA-Ebene gegenüber Wildtyp-Mäusen nicht verändert.



**Abb. 23b+c: Analyse der Proteinexpression von Mitofusin 2 im Musculus quadriceps femoris**

Demgegenüber zeigt sich auf Proteinebene ein interessanter biphasischer Verlauf: Zum Zeitpunkt von 4 Wochen liegt in der PARL-defizienten Muskulatur eine um knapp das 3-fache erhöhte Proteinexpression von Mfn 2 gegenüber der Wildtyp-Muskulatur vor (Abb. 23b). Die Muskelproben von 12 Wochen alten PARL-defizienten Mäusen zeigen hingegen eine um knapp die Hälfte verringerte Proteinexpression (Abb. 23c).

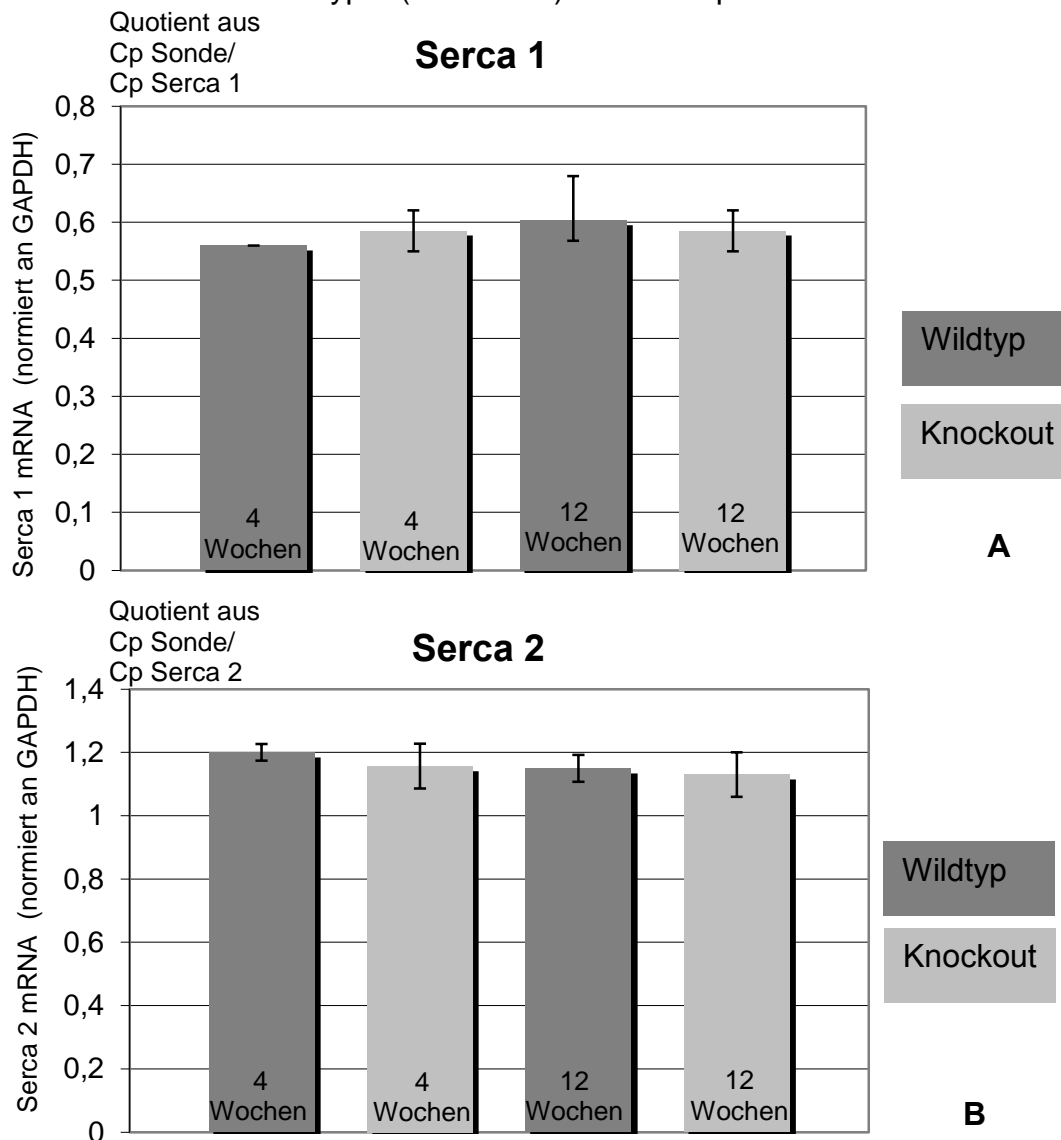


**Abb. 23d+e: Analyse der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung von Mitofusin 2 im Musculus quadriceps femoris**

Fluoreszenzmikroskopisch lässt sich kein qualitativer Unterschied von Mitofusin 2 zwischen Wildtyp- und PARL-defizienter Muskulatur nachweisen (Abb. 23d+e).

#### 4.9 PARL-defiziente Muskulatur zeigt keine Veränderung der SERCA-Genexpression

Der Vergleich der mRNA-Expression der Calcium-ATPase SERCA 1 in 4 Wochen und 12 Wochen alten Muskelproben ist in Abb. 24a dargestellt. Neben der Untersuchung auf das Vorliegen eines veränderten Calciumhaushalts lässt sich eine erste Aussage über mögliche Änderungen des Fasertypenprofils der Muskeln machen, da das SERCA 1 Gen ausschließlich in Typ 2 (fast-twitch) Fasern exprimiert wird.



**Abb. 24: Analyse der SERCA 1 und SERCA 2-Expression im Musculus quadriceps femoris bei Wildtyp- und Knockout- Mäusen im Alter von 4 und 12 Wochen**

Die prozentuale Differenz der Mittelwerte aus den Quotienten der Crossing points der Muskelproben zwischen Wildtyp und Knockout von 4 Wochen alten Mäusen (Säule 1 und 2) liegt bei 4,5 %, die von Muskelproben von 12 Wochen alten Mäusen (Säule 3 und

4) bei 3,1 % (Erläuterungen zur „Auswertung der qPCR Ergebnisse“ s. 3.6 im Methodenteil)

Es liegt somit keine veränderte mRNA-Expression von SERCA 1 vor.

Die Analyse von mRNA-Expressionsunterschieden in 4 Wochen und 12 Wochen alten Muskelproben einer weiteren Calcium-ATPase SERCA 2 ist in Abb. 24b abgebildet. Im Gegensatz zu SERCA 1 wird das SERCA 2 Gen ausschließlich in Typ 1 (slow-twitch) Fasern exprimiert und erlaubt somit sowohl eine Aussage über das Vorliegen eines veränderten Calciumhaushalts als auch über eine mögliche Änderung des Fasertypenprofils.

Die prozentuale Differenz der Mittelwerte aus den Quotienten der Crossing points der Muskelproben zwischen Wildtyp und Knockout von 4 Wochen alten Mäusen (Säule 1 und 2) liegt bei 3,7 %, die von Muskelproben von 12 Wochen alten Mäusen (Säule 3 und 4) bei 1,8 %.

Somit lässt sich anhand der nur geringen mRNA-Differenzen von SERCA 1 und SERCA 2 zwischen Wildtyp und Knockout weder eine Veränderung der Genexpression von Calcium-ATPasen noch ein verändertes Fasertypenprofil detektieren.



## 5. Diskussion

### Der PARL-Knockout Phänotyp

Die Defizienz von PARL, einer Protease der inneren Mitochondrienmembran, führt nach normaler prä- und früh postnataler Entwicklung ab etwa der 4. Woche zu einer multi-systemischen Atrophie verbunden mit einem Einbruch der Gewichtszunahme. Zwischen der 8. und 12. Woche sterben die Mäuse, möglicherweise als Konsequenz aus den Atem- und Bewegungsschwierigkeiten und der generellen Kachexie (Cipolat et al., 2006). Die genaue Charakterisierung des Muskelschwunds war Ziel der vorliegenden Arbeit.

Bei der Quantifizierung der Muskelfaserquerschnittsflächen bei einer Maus im Alter von 4, 8 und 12 Wochen zeigt die PARL-defiziente Maus gegenüber der Wildtyp-Maus im Alter von 12 Wochen eine um bis zu 50 % geringere Muskelfaserquerschnittsfläche. Dabei zeigen die hochauflösende Lichtmikroskopie anhand von Semidünnschnitten sowie die Transmissionselektronenmikroskopie neben der progredienten Kaliberdifferenz nur wenige qualitative Unterschiede wie eine basophile Tüpfelung, eine in einzelnen Fasern deutlich aufgelockerte Faseranordnung sowie vereinzelnde Fasern mit weniger Mitochondrien. Eine zur besseren Beurteilung der Anordnung von Mitochondrien und SR zueinander durchgeführte Analyse mit einer intrazellulären REM nach Mazeration zeigt eine unveränderte Topographie der Anordnung von Mitochondrien, SR und T-Tubuli.

Die in der Erstbeschreibung der PARL-defizienten Maus von Cipolat et al. (2006) hypothetisch angeführte Option einer nukleären Apoptose mit Verlust von Kerndomänen wurde durch einen TUNEL-Assay experimentell untersucht; mit dem Assay konnte jedoch keine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden.

Auf biochemischer Ebene zeigen die Mitochondrien bei PARL-defizienten Mäusen deutliche Veränderungen. Besonders hervorzuheben sind eine Reduktion der Expression von SDHA/Komplex II und eine progrediente Reduktion der Expression der ATP-Synthase B. Bei einem Energiedefizit wäre als Kompensationsmechanismus eine erhöhte posttranslationale Phosphorylierung des Energiesensors Ampk zu erwarten (Carling et al., 2004); die Knockout-Muskelproben von 4 Wochen alten Mäusen zeigen hingegen eine deutlich verringerte Phosphorylierung. Die Hauptfunktion der Atmungskette ist die Produktion von Energieträgern wie ATP, demnach würde man bei einer Mutation

oder verringerten Proteinexpression in einem der Atmungskettenenzyme eine Reduktion des ATP–Spiegels annehmen; beispielsweise bei Patienten mit einem isolierten Defekt der ATP-Synthase ist neben diversen anderen Pathologien eine Atmungsketteninsuffizienz beschrieben wurden (Sperl et al., 2006).

Ein Verlust mtDNA, wie es bei einem Ausfall von SDHA über seine Funktion als Antioxidans zu fungieren zu erwarten wäre (Ernster et al., 1995), konnte nicht gezeigt werden.

### **PARL–defiziente Mäuse zeigen ab der vierten postnatalen Woche einen systemischen Muskelschwund**

Die PARL-Knockout Mäuse entwickeln von der 4. bis zur 12. postnatalen Woche gegenüber dem Wildtyp eine reduzierte Muskelfaserquerschnittsfläche von Muskeln aus unterschiedlichen Körperregionen (M. quadriceps femoris, M. tibialis anterior, M. biceps brachii und Bauchwandmuskulatur). Verlauf und Kinetik der Abnahme differieren dabei unter den untersuchten Muskeln. Die Muskelfaserquerschnittsfläche bei 12 Wochen alten PARL-Knockout Mäusen ist gegenüber dem Wildtyp um ~50% kleiner. Dabei wird beim M. tibialis anterior, dem M. quadriceps femoris und der Bauchwandmuskulatur von der vierten bis zur zwölften Woche eine progrediente Flächenreduktion bei PARL-defizienten Mäusen beobachtet; beim M. biceps brachii vergrößert sich die Muskelfaserquerschnittsfläche im gleichen Zeitraum, bleibt dabei jedoch deutlich hinter dem postnatalen Wachstum der Muskelfasern beim Wildtyp zurück. Interessanterweise entspricht das Ausmaß der Kaliberreduktion recht genau den bei der Sarcopenie des Menschen beobachteten Werten (zwischen dem 20. bis 60. Lebensjahr beträgt die Querschnittsflächenreduktion ~40 % (Doherty, 2003)).

Die verkürzte Lebenszeit mit dem verfrühten Versterben um die 8. postnatale Woche beschrieben Cipolat et al. (2006) als mögliche Konsequenz aus den Atem- und Bewegungsschwierigkeiten. Die in meiner Arbeit verwendeten PARL-Knockout Mäuse erreichten ein Alter von etwa 12 Wochen; das Ausmaß und die Kinetik der hier quantifizierten Abnahme der Muskelmasse unterstützen die von Cipolat et al. geäußerte Vermutung über die mögliche Todesursache.

### **Faser- und Mitochondrienmorphologie bleiben in PARL-defizienter Muskulatur weitestgehend unverändert**

Das lichtmikroskopische Bild der Muskelfasern der PARL-Knockout Mäuse zeigt eine Faserkaliberreduktion mit einem selbst nahe des Todeszeitpunktes um die 12. postpartale Woche weitestgehend unverändertem, histologischem Bild. Sowohl das lichtmikroskopische wie auch das transmissionselektronenmikroskopische Bild weisen eine normale Faserkonfiguration ohne Merkmale einer Muskeldystrophie auf, mit lediglich vereinzelter Fasern mit Lücken im Besatz mit Mitochondrien zwischen den Sarkomeren, deren Raum durch verknäulte L-Tubuli des SRs gefüllt werden. Die Mitochondriengröße und die ultrastrukturelle Beschaffenheit von Mitochondrien präsentieren sich transmissionselektronenmikroskopisch ohne Auffälligkeiten. Das sich hier präsentierende weitestgehend unveränderte Bild bei der Ablation von PARL bestätigt das von Pellegrini bereits 2007 beschriebene PARL-Knockout Bild mit einem unveränderten mitochondrialen Retikulum und einer physiologischen mitochondrialen Atmung.

Bei einer neurogenen Muskelatrophie steht die Kaliberreduktion motorischer Einheiten im Vordergrund. Es entsteht ein sehr heterogenes Bild mit Fasergruppen unterschiedlicher Kalibergrößen. Primär kommt es nicht zu einem Faseruntergang, sondern vielmehr zu einer Faserschrumpfung mit allenfalls segmentalen Nekrosen, Vakuolen, veränderten Strukturproteinen, Anhäufungen von intrazytoplasmatischen Ablagerungen, Proliferation der Satellitenzellen als Zeichen der Regeneration oder Muskelfaserhypertrophien (Lammens et al., 2009). Die typischen Merkmale einer neurogen bedingten Muskelerkrankung sind bei der PARL-defizienten Maus jedoch nicht nachweisbar. Im peripheren Nerven, aber auch intramuskulär konnten keine Hinweise auf degenerierende Axone oder Defekte der Myelinscheide gefunden werden.

Genauso wenig zeigt sich das typische Bild einer Dystrophie mit Faserzerstörungen, Fibrosierungen als Zeichen einer frustranen Regeneration, unimodalen Kalibervariationen mit Einzelfaseratrophien und –hypertrophien, Muskelfasernekrosen mit Phagozytose, regenerierenden Fasern, Faser-Splittings oder pathologischen Kernzentralisationen (Neuen-Jacob, 2009). Die für eine Atrophie typisch erhöhte Aktivierung der Autophagie (Sandri, 2010) konnte bei der Proteinexpressionstestung von Apg 7, einem Autophagiemarker insbesondere in der Skelettmuskulatur, an PARL-defizienten

Muskelproben nicht festgestellt werden. Genauso wenig waren die bei einer Autophagie entstehenden Autophagievakuolen elektronenmikroskopisch detektierbar.

Deinnervierte, atrophische (Romanello et al., 2010) und dystrophische Muskulatur (bei Kollagen 6-Knockout Mäusen, Irwin et al., 2006) zeigen ein ungeordnetes Mitochondrienetzwerk. Sowohl für atrophische als auch für dystrophische Muskelfasern wird angenommen, dass über eine Hochregulation der Autophagie das Mitochondrienetzwerk wieder hergestellt werden kann (Atrophie- Romanello et al., 2010; Dystrophie- Grumati et al., 2010). Weder konnten ultrastrukturelle Mitochondrienveränderungen noch eine Hochregulation der Autophagie detektiert werden, was eine neurogene, atrophische oder dystrophische Genese des Muskelschwunds bei der PARL-Knockout Maus weniger wahrscheinlich macht.

### **Eine PARL-Defizienz führt nicht zum typischen Bild einer mitochondrialen Muskeldystrophie**

Da PARL eine Protease der inneren Mitochondrienmembran ist, liegt zunächst die Vermutung nahe, dass sich das typische Bild einer mitochondrial bedingten Muskel-erkrankung entwickeln könnte. Mit dem Begriff der mitochondrial bedingten Muskel-erkrankungen werden primär Erkrankungen assoziiert, die auf Defekten der Atmungskette basieren, die OXPHOS-Mutanten (Lammens et al., 2009). Das typische lichtmikroskopische Bild einer OXPHOS-Mutante sind die bereits in der Einleitung (unter 1.1.2 „Myogen bedingte Degenerationsformen“) erläuterten RRF und die Mitochondrienansammlungen neben Lipidvakuolen und Glykogenablagerungen. Nicht nur die PARL-Knockout Maus sondern z. B. auch Patienten mit Leigh Syndrom (DiMauro et al., 2003), denen ein mitochondrialer Defekt zugrunde liegt, zeigen nicht das Bild einer voll ausgeprägten OXPHOS-Mutante mit RRF (z.B. Horváth et al., 2006). Die Ausprägung lichtmikroskopischer Charakteristika ist bei einem mitochondrialen Defekt demnach variabel, möglicherweise abhängig vom Schweregrad des mitochondrialen Defekts oder den Kompensationsmöglichkeiten.

### **PARL-Defizienz führt zu keiner erhöhten Apoptose-Aktivierung**

An Mausmodellen wurden diverse Faktoren, wie u. a. das Vorliegen einer erhöhten Apoptoserate diskutiert bzw. bestätigt (Hiona et al., 2010). Da PARL-Substrate in der

Apoptoseregulation involviert sind, ist auch für PARL selbst die Frage nach der Beeinflussung der Apoptose zu klären.

Die PARL-Substrate OPA1 und Omi haben eine über unterschiedliche Mechanismen ablaufende inhibitorische Funktion auf die Apoptose. Diese Erkenntnis und die bei der PARL-Knockout Maus bereits beschriebene erhöhte Apoptose in lymphatischen Organen (Cipolat et al., 2006) motivieren die Untersuchung der Apoptose in PARL-defizienter Muskulatur als mögliche Ursache der hier vorliegenden reduzierten Muskelfaserquerschnittsgröße. Gleichzeitig gibt es diverse Veröffentlichungen, die unterschiedliche Apoptosesignalwege als Pathomechanismus der Sarcopenie beschreiben: Caspase-unabhängige Signalwege (Dirks et al., 2002; Marzetti et al., 2008a; Barker et al., 2006; Leeuwenburgh et al., 2005), eine erhöhte Öffnungsanfälligkeit der mPTP (Tamilselvan et al., 2007; Seo et al., 2008) sowie Mitochondrien-unabhängige Apoptose wie z. B. über TNF  $\alpha$  (Phillips et al., 2005; Pistilli et al., 2006a; Marzetti et al., 2008b; Marzetti et al., 2009).

Die TUNEL-Testung, die die in der Endphase der Apoptose entstehenden DNA-Fragmente durch eine lokalisierte Färbung sichtbar macht, gibt sowohl für 4 Wochen als auch für 12 Wochen alte Muskelzellen keinen Anhalt für das Vorliegen von DNA-Fragmenten; es lässt sich allerdings kein Rückschluss auf eine durch PARL-bedingte Beeinflussung einzelner Schritte der Apoptose machen. Es lässt sich lediglich festhalten, dass in PARL-defizienter Muskulatur keine in der Endphase der Apoptose entstehenden DNA-Fragmente nachweisbar sind.

Neben dem TUNEL-Test wurde auf Proteinebene ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran untersucht, VDAC, das über die Bildung von Porin-Kanälen an der Cytochrom c Freisetzung aus dem Mitochondrium beteiligt ist. Sowohl die Muskelproben von 4 Wochen als auch von 12 Wochen alten Mäusen zeigen keine Unterschiede in der Proteinexpression von VDAC; die Proteinexpression im Alter von 12 Wochen ist sogar nahezu identisch.

### **Bleibt die Mitochondrienfusion durch PARL-Defizienz unbeeinflusst?**

Motiviert durch die in anderen Organismen vorliegende Funktion von mitochondrialen Rhomboiden in der Mitochondrienfusion, sollte die PARL-Knockout Maus auf das Vorliegen einer dysfunktionalen Mitochondrienfusion untersucht werden.

Sowohl in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als auch in *Drosophila* regulieren mitochondrial gelegene Rhomboide die Mitochondrienfusion (McQuibban et al., 2003). Die konkreten Folgen einer gestörten Mitochondrienfusion sind zwar derzeit noch ungeklärt; es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine gestörte Mitochondrienfusion ausgelöst durch OPA 1- oder Mfn 1/2-Mutationen zu einem Verlust des Mitochondrienpotenzials und der oxidativen Phosphorylierungskapazität führt (Olichon et al., 2003; Chen et al., 2005).

Auch wenn bislang in Säugetieren keine Funktion mitochondrialer Rhomboide in der direkten Membranfusion nachgewiesen werden konnte, bleibt es trotzdem noch spannend zu untersuchen, ob die Defizienz der mitochondrialen Rhomboid-Protease PARL zu einer veränderten Mitochondrienfusion führt.

Die Expression von Mfn 2 ist auf mRNA-Ebene gegenüber Wildtyp-Mäusen nicht verändert. Demgegenüber zeigt sich auf Proteinebene ein interessanter biphasischer Verlauf, mit erhöhter Mfn 2-Konzentration bei 4 Wochen alten Tieren, gefolgt von einer ~50 %igen Reduktion bei 12 Wochen alten PARL-Knockout Mäusen.

Die veränderte Proteinexpression von Mfn 2 könnte zu einer Beeinflussung der ER-Mitochondrien-Interaktion und/oder Mitochondrienfusion durch PARL führen. Möglicherweise kann im Alter von 4 Wochen die Interaktion zwischen Mitochondrien bzw. zwischen ER- und Mitochondrium durch eine Hochregulation von Mfn 2 kompensiert werden. Dieser Kompensationsmechanismus dekompenziert allerdings bis zur 12. Woche und führt letztlich zu einer verringerten Proteinexpression von Mfn 2.

### **PARL-Defizienz führt zu einer Reduktion von SDHA und ATPB**

Bei der weiteren Suche nach vorliegenden mitochondrialen Dysfunktionen der PARL-Knockout Maus zeigt sich v. a. bei 4 Wochen alten Tieren eine sehr deutlich ausgeprägte Reduktion von SDHA. SDHA ist eine der 4 Untereinheiten des Succinat-Dehydrogenase-Komplexes, dem Komplex II der Atmungskette. Der Verlust von SDH führt neben dem Verlust der einzigen Dehydrogenase Aktivität der Atmungskette zum Verlust des Antioxidansschutzes über die Reduktion des Ubiquinol-Pools (Ernster et al., 1995). Bei Komplex II-Defizienz sind sehr variable Phänotypen in der Literatur beschrieben: progressive Enzephalopathie (Riggs et al., 1984), hypertrophe Kardiomyopathie (Rustin et al., 1993), Leukodystrophie (Bourgeois et al., 1992),

Muskelschwäche (Arpa et al., 1994) oder neurologische Auffälligkeiten (Brockmann et al., 2002). Der Verlust von Komplex II lässt sich in zwei Untergruppen unterteilen: Die eine Gruppe, die das typische Bild einer OXPHOS-Mutante bietet, und die andere Gruppe, die sich durch das Fehlen der für eine OXPHOS-Mutante typischen RRF abgrenzt und als Leigh Syndrom klassifiziert wird (DiMauro et al., 2003) (Erläuterungen zum Leigh Syndrom in der Einleitung unter 1.1.2 und im nächsten Abschnitt).

Unter den Veröffentlichungen bei Komplex II-Defizienz finden sich Beschreibungen über auffällige Muskelbefunde: Muskelbiopsien von 2 Kindern (7 und 9 Jahre) zeigen Mitochondrienaggregate und ausgeprägte Fetttropfchen in den Muskelfasern (Riggs et al., 1994), die Muskelprobe eines 25-jährigen Mannes mit Kearns-Sayre Syndrom und isolierter Komplex II-Defizienz präsentiert RRF mit einigen abnorm geformten Mitochondrien mit parakristallinen Einschlüssen (Rivner et al., 1989). In der von Arpa et al. (1994) beschriebenen Muskelprobe einer 22-jährigen Patientin mit generalisierter Muskelschwäche zeigen sich histopathologisch keine RRF, lediglich ein geringer Überschuss an Lipiden und subsarkolemmale Granula sind zu detektieren.

Die PARL-Knockout Maus weist Parallelen zu der von Arpa et al. (1994) beschriebenen Patientin auf, deren Muskelprobe histopathologisch keine RRF zeigt und die sich klinisch mit Muskelschwäche präsentierte. Gleichzeitig lässt sich festhalten, dass der Verlust von Komplex II zu einem sehr heterogenen Phänotyp führen kann, der Befund der PARL-Knockout Maus aber durchaus mit den bereits in der Literatur beschriebenen Befunden vereinbar ist.

Neben der verringerten Proteinexpression von SDHA zeigt ATPB, die  $\beta$ -Untereinheit des F<sub>1</sub>-Komplexes der ATP-Synthase, eine verringerte Proteinexpression. Bei einem angeborenen Defekt der ATP-Synthase kommt es in den meisten Fällen im Neugeborenenalter zu Hypotonie, Laktatazidose, Hyperammonämie, hypertropher Kardiomyopathie und 3-Methylglutaconic Azidurie (Mayr et al., 2010; Sperl et al., 2006). Bei allen Patienten mit einem angeborenen ATP-Synthase-Defekt setzte die klinische Symptomatik bereits im Neugeborenenalter ein, wobei die Überlebenszeit differierte; die Hälfte der 14 untersuchten Kinder verstarben bereits im Kindesalter (Sperl et al., 2006). Bei den untersuchten Patienten konnte als weitere Konsequenz aus der Atmungsketteninsuffizienz eine erhöhte mitochondriale ROS-Konzentration in Fibroblasten gemessen werden.

Die Befunde an der PARL-Knockout Maus mit einer verringerten Proteinkonzentration von ATPB zeigen wie die untersuchten Patienten mit einem angeborenen ATP-Synthesedefekt eine verringerte Lebenserwartung.

Da beispielsweise bei Patienten mit einem isolierten Defekt der ATP-Synthase neben diversen anderen Pathologien eine Atmungsketteninsuffizienz beschrieben wurde (Sperl et al., 2006), sollten die PARL-Knockout Mäuse auf das Vorliegen eines Energiedefizits untersucht werden. In der Genexpression von den untersuchten Energiesensoren Sirt1 und Ampk zeigt sich kein Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout. Das Vorliegen eines Energiedefizits ausgelöst z. B. durch Hypoxie, Glukoseentzug oder schnelle Muskelkontraktion würde als gegenregulatorische Antwort eine erhöhte Aktivierung (=Phosphorylierung) von Ampk auslösen (Carling et al., 2004), die allerdings bei der PARL-Knockout Maus nicht nachweisbar ist. Hypothetisch könnte auch gerade die PARL-Defizienz diesen Gegenregulationsmechanismus stören und über diesen Mechanismus ein bereits bestehendes Energiedefizit verstärken.

**Gibt es Krankheiten oder Tiermodelle, in denen wie bei der PARL-Knockout Maus ein Atmungskettendefekt nicht zur Entwicklung des typischen Phänotyps eines OXPHOS-Defektes führt?**

Ein alleiniger Verlust des Komplex II kommt mit einem Anteil von nur 2-4 % an allen Atmungskettenkomplexdefekten nur sehr selten vor (Parfait et al., 2000).

Unabhängig davon in welcher der vier Untereinheiten eine Mutation auftritt, resultiert daraus eine verringerte SDH Aktivität. Von der Atmungskettenaktivität, die bei hohen ATP-Spiegeln verringert ist, bleibt SDH unbeeinflusst (Gutman, 1987).

Bei einer angeborenen Schädigung von SDH durch eine Mutation in SDHA ist die Aktivität immer noch zu 25 % bis 50 % im Vergleich zu Kontrollwerten erhalten (Parfait et al., 2000). Im Vergleich dazu ist bei einem Defekt von Komplex I oder IV nur noch eine Restaktivität von weniger als 5 % vorhanden. Patienten mit einem Defekt von SDHA zeigen das typische klinische Bild eines Leigh Syndroms. Das Leigh Syndrom kann durch nukleär und mitochondrial kodierte Gene, die einen der fünf Komplexe der Atmungskette oder den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex kodieren, ausgelöst werden (DiMauro et al., 1996). Das Besondere oder die Parallele zum PARL-Modell liegt darin, dass Patienten mit Leigh Syndrom, dem ein mitochondrialer Defekt zugrunde liegt, nicht



das Bild einer voll ausgeprägten OXPHOS-Mutante mit red ragged fibers bieten (DiMauro et al., 2003), sondern ein dem PARL-Mausmodell ähnliches histologisches Bild.

Auffallend ähnliche bzw. in einigen Punkten übereinstimmende Befunde liegen zwischen einem Kind mit Leigh Syndrom und der PARL-Knockout Maus vor: Eine Muskelprobe aus dem linken M. tibialis anterior des Kindes mit Leigh Syndrom zeigte weder licht- noch elektronenmikroskopische Auffälligkeiten noch histochemische Differenzen bei SDH in jeglichen Fasern (Horváth et al., 2006). Biochemisch konnte eine deutlich verringerte Aktivität von Komplex II mit einer Restaktivität von 23 % detektiert werden; dabei war keine Abnormalität in der Aktivität von anderen Atmungskettenenzymen wie der Pyruvate-Dehydrogenase oder der Citrat-Synthase nachweisbar (Horváth et al., 2006). Beim Immunoblotting mit anti-SDHA Antikörper zeigte sich ein deutlich verringertes Signal im Vergleich zu Kontrollen (Horváth et al., 2006).

Im Gegensatz zu einer immer noch vorhandenen Restaktivität von 25 % bis 50 % von SDH bei einer Mutation in SDHA, ist die Aktivität von SDH bei Patienten mit gutartigem, neuroendokrinem Tumor aus einem autonomen Ganglion, dem Paragangliom, nur gering detektierbar (Gimenez-Roqueplo et al., 2001). Wie oben bereits erwähnt, kann sich ein Verlust der SDH-Aktivität nicht nur in einer verringerten ATP-Produktion äußern, sondern auch in einer verringerten Reduktion des Ubiquinol-Pools, was dann wiederum zum Verlust der anti-oxidativen Kapazität der Atmungskette führt und somit oxidativen Stress auslöst.

Die erwähnte Rolle von SDH als Antioxidans wird durch die Beobachtung in *Caenorhabditis elegans* bestätigt. Es wurde eine SDH-Mutation gefunden, die zu einer Hypersensitivität gegenüber Sauerstoff führt (Ishii et al., 1998), und letztlich ein verfrühtes Absterben der Würmer bedingt. Bei Menschen führt eine Mutation in einer der SDH-Untereinheiten zu einem kompletten Funktionsverlust von Komplex II. Der komplette Verlust der Komplex II-Funktion löst eine vermehrte Superoxid-Produktion bzw. eine verringerte Eliminierung aus. Eine Überproduktion von Superoxiden führt bei Menschen anerkanntermaßen zur Tumorbildung und in mutierten Würmern zu einer Hypersensitivität gegenüber Sauerstoff. Sowohl die Tumorbildung beim Menschen, als auch die Hypersensitivität gegenüber Sauerstoff bei Würmern lässt sich über die verminderte Aktivität von SDH den Ubiquinol-Pool zu reduzieren, erklären. Die

Reduktion des Ubiquinol-Pools ist wichtig, um oxidativem Stress resistieren zu können (Rustin et al., 2002).

### **Liegt bei der PARL-Knockout Maus ein Verlust mtDNA dem Muskelschwund zugrunde?**

Der Verlust der mitochondrialen Rhomboid-Protease PARL führt zu einer verminderten SDHA Proteinexpression, die sich nicht wie ein typischer Atmungskettendefekt mit dem lichtmikroskopischen Bild mit red ragged fibers präsentiert. SDH fungiert (wie oben bereits erwähnt) nicht nur als Elektronentransporter der Atmungskette, sondern auch als Antioxidans in biologischen Membranen (Ernster et al., 1995). Wie bei *Caenorhabditis elegans* beschrieben, könnte die Muskelschädigung bei den PARL-defizienten Mäusen über eine verringerte Superoxid-Eliminierung ausgelöst sein.

Die Akkumulation von ROS resultiert v. a. in einer Schädigung mtDNA (Montoya et al., 2009). Der beschriebene Mechanismus, dass die verringerte Proteinexpression von SDHA zu erhöhter Superoxid-Konzentration im Mitochondrium führt, die wiederum Schäden der mtDNA verursacht und darüber eine Muskelschädigung in Form einer Sarcopenie auslöst, scheint ein plausibler Entstehungsmechanismus einer Sarcopenie zu sein: Schäden der mtDNA als Ursache der Sarcopenie werden in diversen Papern diskutiert (z. B. Wanagat et al., 2001; Hiona et al., 2010).

Um das Vorliegen von DNA-Schäden bei der PARL-Maus festzustellen, wurde mittels qPCR die mtDNA/ nDNA Ratio in Muskelproben bestimmt. Dabei liess sich kein Anhalt für mtDNA-Verlust bei PARL-defizienten Mäusen finden, so dass zumindest gravierende mtDNA-Schädigungen eher unwahrscheinlich sind. Eine Akkumulation geringgradiger Defekte kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Wanagat et al. (2001) postulierten, dass Mutationen –kein Verlust- der mitochondrialen DNA zu Muskelschwund und –verlust im Rahmen einer Sarcopenie beitragen können. Laserelektronenmikroskopische Untersuchungen und Amplifikationen des mitochondrialen Genoms zeigten in Bereichen mit abnormen Mitochondrien mitochondriale DNA Mutationen. Es zeigte sich sowohl bei der Muskelmasse der Bauchwandmuskulatur als auch bei der Faseranzahl ein biphasischer Verlauf: Zwischen dem 5. und 18. Monat nahm die Muskelmasse des M. rectus abdominis einer Mischlingsratte mit einer nicht signifikanten Faseranzahlreduktion geringfügig zu, zwischen dem 18. bis

38. Monat reduzierte sich die Muskelmasse mit einer signifikanten Faserreduktion. Wanagat et al. (2001) erklärten sich das Phänomen durch eine progrediente Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien, bei der erst durch Überschreiten einer Schwelle durch eine erhöhte ROS-Konzentration eine klinische Symptomatik bzw. funktionelle Einschränkung resultiert.

Die Erklärung von Wanagat et al., dass für den plötzlichen signifikanten Faserverlust und Muskelmassenverlust eine Anhäufung dysfunktionaler Mitochondrien verantwortlich ist, bietet einen möglichen Erklärungsansatz für den bei der PARL-Knockout Maus plötzlich einsetzenden Tod nach der 12. postnatalen Woche: Bis zur 4. Woche sind die Mitochondrien der PARL-Knockout Maus suffizient, danach treten progrediente Organeinschränkungen/-schäden auf (Cipolat et al., 2006). Letztlich kommt es zu einer Dekompensation der Mitochondrien mit einem verfrüht einsetzenden Tod um die 12. Woche, wobei selbst zu diesem Zeitpunkt die morphologisch sichtbaren Schäden an den Organellen erstaunlich gering sind. Parallel zu den Befunden von Wanagat et al. zeigt die PARL-Knockout Maus keinen mtDNA-Verlust, ob wie bei Wanagat et al. mtDNA-Mutationen den Muskelbefund bedingen, bleibt noch zu klären.

### **Spielt PARL beim Menschen eine Rolle für die Atmungskettenfunktion?**

Der Zusammenhang eines Atmungskettendefekts und einer verringerten Expression von PARL ist in der Literatur bereits indirekt bei der Ursachenerforschung des Diabetes mellitus Typ 2 beschrieben. Typ 2-Diabetiker zeigen eine verringerte PARL-Expression in der Skelettmuskulatur (Walder et al., 2004). Gleichzeitig wird die PARL Genexpression mit der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierungskapazität assoziiert. Viele Studien haben die Annahme eines Zusammenhangs zwischen oxidativer Phosphorylierung in der Skelettmuskulatur und dem Diabetes mellitus Typ 2 gestützt (Simoneau et al., 1997; Petersen et al., 2003). Mit der Erkenntnis, dass PARL eine Rolle im Pathomechanismus von Typ 2-Diabetes spielt, lässt sich ein möglicher kausaler Zusammenhang zwischen PARL und der Entstehung eines Atmungskettendefekts herstellen. Allerdings äußert sich der bei der PARL-Knockout Maus detektierte Atmungskettendefekt nicht in dem typischen Bild eines voll ausgeprägten mitochondrialen Atmungskettendefekts.

Indirekt sind zudem zwei weitere Atmungskettendefekte in der Literatur beschrieben, die allerdings nicht direkt durch eine PARL-Defizienz ausgelöst sind, sondern über eine Mutation in dem PARL-Substrat OPA1. In *Drosophila* wurde bei einer Mutation von OPA1 eine verringerte Funktion von Komplex II und III detektiert, wohingegen die Funktion von Komplex I und IV normal blieb (Tang et al., 2009). Zudem wurde in Haut-fibroblastenzellen von DOA-Patienten mit einer Mutation in dem für OPA1-kodierenden Gen ein selektiver Defekt von Komplex I gefunden (Zanna et al., 2008). Der dem selektiven Atmungskettendefekt zugrunde liegende Pathomechanismus ist noch strittig; es wird eine verringerte Kopienanzahl von mtDNA (Kim et al., 2005) sowie eine Interaktion zwischen OPA1 und „apoptose inducing factor“ (AIF) diskutiert (Zanna et al., 2008). Beide beschriebenen Atmungskettendefekte ausgelöst über PARL-Substrate bieten keinen vergleichbaren Phänotyp zur PARL-Knockout Maus.

Ein weiteres bisher allerdings in der Literatur nicht beschriebenes Modell könnte eine Veränderung in der Anordnung und Funktion der Atmungskettenenzymkomplexe bedingt durch eine veränderte Cristae Struktur über die Funktion von OPA1 als „Flaschenkorken“ der Cristae (Arnould et al., 2005) zu fungieren sein. Wenn die PARL-Defizienz eine deregulierte Funktion von OPA1 bedingt, könnte daraus eine veränderte Cristae Struktur resultieren, die zu Veränderungen in den Atmungskettenenzymkomplexen führen könnte. Eine Beeinflussung der Atmungskette wurde bereits für andere Moleküle, die wie OPA1 am Crista remodelling beteiligt sind, beschrieben.

Strub et al. (2011) beschrieben eine Beeinflussung der Anordnung des Enzyms Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) über ein in der inneren Mitochondrienmembran gelegenes Sphingolipid -Sphingosin-1-Phosphat. Eine anormale Anordnung von COX ist häufig mit Atmungskettendefekten assoziiert und kann zu einer defekten oxidativen Phosphorylierung führen (Fernandez-Vizarra et al., 2009). Für den Verlust eines anderen Proteins in der inneren Mitochondrienmembran Prohibitin 1, das in Hefen an der Regulation mitochondrialer Funktionen beteiligt ist, wurde eine Blockierung von Komplex I beschrieben, die u. a. zu einer erhöhten ROS-Konzentration führt (Schleicher et al., 2008).

### Inwiefern können Parallelen der PARL-Knockout Maus zu Mutationen in PARL-Substraten gezogen werden?

In der Maus sind als PARL-Substrate OPA1, HtrA2/Omi und PINK1 bekannt. Sowohl OPA1 als auch Omi werden als Apoptoseregulatoren beschrieben, PINK1 bietet v. a. eine protektive Rolle gegenüber oxidativem Stress.

- **OPA1** verhindert die für die mitochondriale Apoptoseinduktion entscheidende Freisetzung von Cytochrom c aus den Cristae (Cipolat et al., 2006). Ob die Regulation von OPA1 allerdings direkt oder nur indirekt über PARL läuft, oder auch andere Proteasen (wie eine Metalloprotease (Guillery et al., 2008)) mitbeteiligt sind, ist derzeit noch Gegenstand der Forschung.

Bei der Annahme, dass PARL die einzige Protease von OPA1 ist, müsste sich bei der PARL-Knockout Maus ein ähnlicher Phänotyp ausprägen wie bei OPA1-Defizienz.

Der Verlust von OPA1 erleichtert die Cytochrom c Freisetzung und führt damit zu einer erhöhten Apoptoserate. Geht man davon aus, dass PARL die einzige Protease ist, die OPA1 spalten kann, müsste bei PARL-Knockouts eine erhöhte Apoptoserate vorliegen. Auch wenn z. B. in der Milz eine erhöhte Apoptose vorliegt, ist selbiges nicht auf die Skelettmuskulatur zu übertragen, in der keine erhöhte Apoptose anhand des TUNEL-Tests detektiert werden konnte. Die Apoptoseregulation über PARL und OPA1 scheint somit organspezifisch zu sein.

In *Drosophila*, die heterozygot für OPA1 ist, wurde eine verringerte Funktion von Komplex II und III detektiert, wohingegen die Funktion von Komplex I und IV normal blieb (Tang et al., 2009). Zudem wurde eine erhöhte Konzentration an ROS, eine verringerte Resistenz gegenüber oxidativem Stress, und eine verringerte Lebenserwartung festgestellt (Tang et al., 2009).

Bei Patienten mit „dominant optic atrophy“ (DOA), bei denen das für OPA1-kodierende Gen mutiert ist, wird eine Beeinflussung der Kopienanzahl von mtDNA (Zanna et al., 2008; Kim et al., 2005, Yu-Wai-Man et al., 2010) und eine Beeinflussung der Atmungskettenkomplexe über OPA1 diskutiert. Lodi et al. (2004) hatten bereits bei einer Mikrodeletion im OPA1 Gen eine defekte oxidative Phosphorylierung in der Skelettmuskulatur bei der phosphorylierten MR-Spektroskopie detektiert. Auslöser der DOA ist eine Haploinsuffizienz von OPA1; der durch die OPA1 Mutation ausgelöste zweite Verlust von mtDNA löst eine Proliferation als Kompensationsmechanismus zur

Erhaltung des Genoms von wild-type mtDNA aus. Sobald allerdings ein kritisches Level an mutierter DNA entstanden ist, wird auch diese repliziert, so dass über die Akkumulation von mutierter DNA ein Verlust der COX-Aktivität resultiert (Yu-Wai-Man et al., 2010).

Ein OPA1-Knockoutmodell existiert nicht, jedoch konnte über eine Ethylnitrosoharnstoff-induzierte Mutation im OPA1-Gen eine 50 %ige Proteinreduktion in allen Geweben ausgelöst werden; die Mäuse starben am 13.5 postnatalen Tag (Davies et al., 2007). Fibroblasten von heterozygoten Eltern zeigten zudem eine erhöhte Mitochondrienfission und –fragmentierung und eine elektronenmikroskopisch sichtbare Degeneration des Sehnervs. Aus den gemachten Befunden folgerten Davies et al. (2007), dass die OPA1-GTPase wichtige Informationen für die retinalen Ganglienzellen und für das frühe embryonale Überleben enthält.

Es lassen sich Parallelen zwischen der PARL-Knockout Maus zu den Befunden bei Mutationen des PARL-Substrats OPA1 ziehen; sowohl Patienten mit dominant optic atrophy als auch *Drosophila*, die heterozygot für OPA1 ist, weisen einen Atmungskettendefekt auf. Die 50 %ige Reduktion von OPA1 führt zu einem verfrühten Versterben. Bei der PARL-Knockout Maus liegt sowohl ein Atmungskettendefekt als auch ein verfrühtes Versterben vor. Über welchen Pathomechanismus der Atmungskettendefekt entsteht bzw. was er verursacht und inwiefern Schäden der mtDNA eine Rolle für den PARL-Phänotyp spielen, bleibt noch zu klären.

An DOA erkrankte Patienten mit einer Mutation im für OPA1-kodierenden Gen hatten genau wie die PARL-Knockout Maus einen selektiven Atmungskettendefekt. Im Gegensatz zu der PARL-Knockout Maus lag bei den getesteten Patienten mit DOA ein selektiver Defekt von Komplex I vor (Zanna et al., 2008). Der selektive Defekt von Komplex I könnte auf die anhand von Immunopräzipitationsergebnissen gestellte Hypothese einer Interaktion zwischen AIF und OPA1 basieren.

OPA1 mutierte Fibroblastenzellen zeigten eine erhöhte Sterblichkeit gegenüber oxidativem Stress als Kontrollzellen, wie es auch in *Drosophila* gezeigt werden konnte (Tang et al., 2009). Neben der erhöhten Anfälligkeit gegenüber ROS zeigte sich zudem eine erhöhte ROS-Produktion, eine partielle Enzymaktivitätsverringerung der Komplexe II und III der Atmungskette und erstmalig für eine Mutation von OPA1 eine verkürzte

Lebensdauer (Tang et al., 2009). Die PARL-defiziente Maus zeigt ein sehr ähnliches Bild mit einer verkürzten Lebensdauer und einem selektiven Atmungskettendefekt.

- **HtrA2/Omi** ist eine im Mitochondrium gelegene Serinprotease, die im Inter-membranraum des Mitochondriums liegt und während der Apoptose in das Zytosol freigesetzt wird (Walle et al., 2008). Es wird kontrovers diskutiert, ob Omi eine pro- oder anti-apoptotisch Funktion hat (Verhagen et al., 2002; Hegde et al., 2002; Chao et al., 2008).

Bei murinen embryonalen Fibroblasten führte der Verlust von Omi zu einer erhöhten Anfälligkeit für die Öffnung der PTP und einem erhöhten Stress-induzierten Zelltod (Jones et al., 2003). Bei Parkinson-Patienten mit einer verringerten HtrA2-Protease-aktivität konnte eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Stress-induziertem Zelltod sowie pathognomonische Lewy bodies detektiert werden (Strauss et al., 2005)

2008 publizierten z. B. Chao et al. ein Modell der Apoptoseregulation, dass eine Interaktion zwischen Hax1 und PARL und eine Regulation von Bax über Omi beschreibt. Hax1-Knockout-Mäuse zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie Mäuse mit einer HtrA2 Mutation mit der gleichen Neuropathologie und Verlust von Lymphozyten, wobei die Ausprägung bei HtrA2-Mäusen ausgeprägter war (Chao et al., 2008). Meine Muskelbefunde der PARL-Knockout Maus mit keiner detektierbaren erhöhten Apoptose stützen die Annahme einer bestehenden Interaktion zwischen Hax1 und PARL, da bei PARL-Defizienz die pro-apoptotische Funktion von Hax1 ausbleiben würde. In der Milz hingegen liegt bei PARL-defizienten Mäusen eine erhöhte Apoptose vor, was in der Milz gegen eine Interaktion zwischen PARL und Hax1 spricht.

Eine weitere diskutierte Funktion von HtrA2 ist eine zytoprotektive Rolle in non-apoptotischen Zellen (Inagaki et al., 2008). Mäuse mit einer homozygoten Punktmutation im Gen für Omi/HtrA2 zeigten u. a. eine verstärkte Stress-Antwort, die zur Akkumulation von ungefalteten Proteinen, zu Defekten der mitochondrialen Atmung und einer erhöhten Produktion von ROS führten (Martins et al., 2004; Jones et al., 2003).

Bei der Annahme, dass PARL als einzige Protease Omi schneidet, würden die hier vorgestellten Befunde der PARL-Knockout Maus die Hypothese stützen, dass Omi zumindest im Muskel keine anti-apoptotische Funktion hat. Die PARL-defiziente Muskulatur zeigt keine erhöhte Apoptose (zumindest nicht das Vorliegen einer erhöhten Endphase der Apoptose), was bei einem Verlust der anti-apoptotischen Funktion von

Omi nicht zu erwarten wäre. In den lymphatischen Organen zeigt sich hingegen eine erhöhte Apoptose bei PARL-Knockout Mäusen, was wiederum für eine anti-apoptotische Funktion von Omi sprechen würde.

Da in den HtrA2-Knockout-Modellen keine Muskeldegeneration beschrieben wird, ist der Muskelphänotyp der PARL-Knockout Maus am ehesten nicht über eine Beeinflussung von PARL über Omi zu erklären.

- **PINK1** liegt im Mitochondrium (Valente et al., 2004) und soll über eine Phosphorylierung von mitochondrialen Proteinen eine Schutzfunktion gegenüber zytotoxischem Stress bieten. Gleichzeitig zeigten Petit et al. (2005) eine protektive Funktion des PINK1 Proteins gegenüber neuronaler Apoptose. Die Regulation von PINK1 im Mitochondrium wird über spannungsabhängige Proteolyse reguliert, wobei eine Zelldepolarisation zu einer schnellen Akkumulierung von PINK1 in geschädigten Mitochondrien führt (Narendra et al., 2010). In HeLa Zellen, Mäusen und menschlichen neuronalen Zellen konnte gezeigt werden, dass die Entfernung geschädigter Mitochondrien durch Autophagie über eine Akkumulierung von PINK1 stattfindet (Narendra et al., 2010).

Bei Menschen führt eine homozygot vorhandene Mutation im PINK1 Gen zur klassischen late-onset (Erkrankungsalter >45 Jahre) Form des Morbus Parkinson (Bentivoglio et al., 2001).

Clark et al. (2006) beschrieben bei PINK1-Defizienz in *Drosophila* männliche Sterilität, apoptotische Muskeldegeneration, mitochondriale Morphologiedefekte, und erhöhte Stresssensibilität z. B. gegenüber oxidativem Stress. Parkin-Defizienz in *Drosophila* löste einen dem *Drosophila* PINK1-Knockout ähnlichen Phänotyp aus. Eine Überexpression von Parkin hingegen führte zu einer Erhaltung der männlichen Fruchtbarkeit und der Mitochondrienmorphologie. Bei gleichzeitiger PINK1- und Parkin-Defizienz entstand ein Phänotyp, der dem eines einzelnen Knockouts (PINK1 oder Parkin) entsprach.

Yang et al. (2006) zeigten bei einer Inaktivierung von PINK1 in *Drosophila* durch RNAi eine anormale Flügelstellung, Energieverlust, selektive Muskeldegeneration und ein verfrühtes Versterben.

Der in *Drosophila* beschriebene PINK1-Knockout-Phänotyp (Clark et al, 2006; Yang et al., 2006) mit Muskeldegeneration und verringerter Lebenszeit zeigt somit deutliche



Parallelen zum PARL-Knockout-Phänotyp (inkl. Männlicher Sterilität, s. Cipolat et al., 2006).

Bei Keimbahnmutationen von PINK1 in Mäusen wird im Kontrast zu diesen Daten ein erheblich milderer Phänotyp beschrieben mit einer beeinträchtigten Mitochondrienfunktion (Gautier et al., 2008). Dabei wird die Lebenserwartung der PINK1-Knockout-Maus im Unterschied zu der PARL-Knockout Maus nicht beeinträchtigt. Die Deletion führte genau wie bei der PARL-defizienten Maus zu keinen signifikanten Veränderungen in der Mitochondrienmorphologie. Sie löste jedoch funktionale Veränderungen mit einer beeinträchtigten mitochondrialen Atmung im Striatum aus, wobei der zerebrale Kortex im Alter von drei bis vier Monaten noch unbeeinflusst blieb und erst im Alter von zwei Jahren eine verringerte Atmungskettenaktivität entwickelt hatte. Für die PARL-Knockout Maus liegen keine Messungen der Atmungskettenfunktion im Striatum vor. Interessanterweise wurden für die PARL-Knockout Maus im Striatum neuronale Apoptosen beschrieben, die jedoch schon zwischen der 4. und 8. Lebenswoche auftraten (Chao et al., 2008). Die Messung der ATP-Spiegel im Striatum durch einen Luciferase assay konnte bei PINK1-Knockout jedoch keine verringerte ATP-Konzentration detektieren. Bei der PARL-Knockout Maus gibt es keine Daten über die Messung von verringerten ATP-Spiegeln in der Muskulatur.

Ein erst dieses Jahr veröffentlichtes Paper über die Prozessierung von PINK1 durch unterschiedliche mitochondriale Proteasen lässt eine Beeinflussung des PARL-Phänotyps über PINK1 ebenfalls als unwahrscheinlich erscheinen: In einem „RNA-mediated interference (RNAi)-based screen“ konnten vier für die PINK1 Prozessierung verantwortliche mitochondriale Proteasen (MPP, PARL, m-AAA und ClpXP) identifiziert werden, wobei PARL und m-AAA redundant zu MPP sind (Greene et al., 2012). PARL-Knockdown führte in Zellkultur lediglich zu einer vermehrten Anhäufung von durch MPP-geschnittene PINK1 Fragmente, wohingegen „full-length“ PINK1 nur geringfügig erhöht war (Greene et al., 2012).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der PARL-Knockout Phänotyp allenfalls begrenzte Parallelen zu dem Phänotyp der OPA1-Mutation und der Inaktivierung des PINK1-Genes in *Drosophila* aufweist. Bei der OPA1-Maus wurden zum einen eine durch eine Mikrodeletion im OPA1 Gen ausgelöste defekte oxidative Phosphorylierung

beschrieben (Lodi et al., 2004) und in der für OPA1 heterozygoten *Drosophila* eine verringerte Funktion von Komplex II und III mit einer erhöhten Konzentration an ROS und einer verringerten Lebenserwartung (Tang et al., 2009). Auch wenn die intakte Mitochondrienmorphologie sowohl bei der PINK1-Knockout Maus als auch bei der PARL-Knockout Maus vorliegt, ist eine Beeinflussung des PARL-Knockout Phänotyps über PINK1 aufgrund fehlender Beschreibungen über eine eingeschränkte Lebenserwartung und die Funktionsübernahme der Prozessierung bei PARL-Defizienz durch eine andere Protease (MPP) unwahrscheinlich (Gautier et al., 2012).

Übereinstimmungen der PARL-Knockout Maus mit den für Omi erhobenen Befunden lassen sich keine finden, da für HtrA2-Knockout Modelle weder ein Atmungskettendefekt noch eine Muskeldegeneration beschrieben werden.

## 6. Zusammenfassung

Für den von Cipolat et al. (2006) beschriebenen Muskelschwund habe ich in meiner Arbeit versucht den Mechanismus zu identifizieren.

Die Muskeln PARL-defizienter Mäuse zeigen morphologisch keine besonderen Auffälligkeiten, die zu bekannten Formen der Muskeldegeneration passen würden; weder zeigt sich das typische Bild einer oxidativen Phosphorylations-Mutanten mit red ragged fibers noch das einer neurogenen Atrophie. Die ausgeprägte Schädigung der Muskulatur bei der PARL-Knockout Maus entspricht eher dem Bild einer Sarcopenie mit einer ausgeprägten Faserschrumpfung. Für die Entstehung einer Sarcopenie werden zwar diverse Ätiologiefaktoren diskutiert, jedoch gibt es bisher noch kein auf zellulärer Ebene basierendes Modell. Der demographische Wandel motiviert nicht zuletzt aus volkswirtschaftlichem Interesse den zellulären Entstehungsmechanismus der Sarcopenie zu entschlüsseln.

Über welchen Mechanismus lässt sich nun die Sarcopenieentstehung bei PARL-Defizienz erklären? Der am deutlichsten ausgeprägte Befund der PARL-Knockout Maus ist die stark verringerte Proteinexpression von SDHA und ATPB. Ein Atmungsketten-defekt lässt primär auf einen ATP-Verlust schließen. Allerdings lässt sich weder auf Genebene noch auf Proteinebene ein Anhalt für das Vorliegen eines Energiedefizits finden. Parallelen zu diesem Phänotyp spiegeln sich im Leigh Syndrom wieder. Dem Leigh Syndrom können Defekte aller Atmungskettenkomplexe zugrunde liegen; es wird auch eine partielle Succinat-Dehydrogenase A-Defizienz als Auslöser des Syndroms beschrieben. Das Leigh Syndrom präsentiert sich klinisch in einem sehr variablen Bild. Ein dem PARL-Knockout ähnliches histologisches Bild zeigte ein Kind mit Succinat-Dehydrogenase A-Defizienz, dessen Muskelprobe genauso wenig Auffälligkeiten wie die PARL-Knockout Maus zeigte.

Das PARL-Modell ist insofern besonders, als dass der mitochondriale Defekt nicht das Vollbild einer oxidativen Phosphorylations-Mutanten mit red ragged fibers zeigt. Obwohl ein Defekt bzw. eine verringerte Proteinexpression von Atmungskettenkomplexproteinen vorliegt und PARL eine mitochondrial lokalisierte Protease ist, präsentiert die PARL-Knockout Maus nicht das typische Bild einer mitochondrial-bedingten Muskel-erkrankung. Das Leigh Syndrom basiert auf dem gleichen Entstehungsmechanismus, nämlich einem selektiven Defekt eines Atmungskettenkomplexes, der sich aber genau

wie bei der PARL-defizienten Maus nicht in dem Bild einer oxidativen Phosphorylations-Mutante äußert.

Wie könnte der durch PARL bedingte Atmungskettendefekt- wenn nicht über einen stark verringerten ATP-Spiegel- dann zu einer Muskelfaserschädigung führen? In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass ein Defekt von Succinat-Dehydrogenase A zu einer erhöhten Superoxid-Produktion führen kann. Die Befunde bei der biochemischen Charakterisierung des Leigh Syndroms stützen die Hypothese für das PARL-Knockout Modell, dass eine erhöhte reaktive Sauerstoffspezies-Konzentration den Muskelschaden bei PARL-Defizienz bedingen könnte. Eine erhöhte Superoxid-Konzentration bzw. eine verringerte Eliminierung führt zu DNA-Schäden. Auch wenn der mitochondriale DNA Gehalt gegenüber nukleärer DNA nicht verringert ist, ist trotzdem eine Schädigung der mitochondrialen DNA als Ursache der Muskelschädigung nicht auszuschließen.

Ein weiteres denkbares, bisher allerdings in der Literatur nicht beschriebenes Modell könnte eine veränderte Anordnung oder/ und Funktion der Atmungskettenkomplexe durch eine veränderte Cristae Struktur über die Funktion von OPA1 als „Flaschenkorken“ zu fungieren sein. Wenn die PARL-Defizienz eine deregulierte Funktion von OPA1 bedingt, könnte daraus eine veränderte Cristae Struktur resultieren, die Veränderungen (strukturell und/ oder funktionell) in den Atmungskettenkomplexen zur Folge haben könnte, und schließlich zu dem bei der PARL-Knockout Maus vorliegenden Atmungskettendefekt führen könnte.

Auch wenn der Pathomechanismus noch nicht definitiv geklärt ist, stellt die PARL-defiziente Maus das erste mögliche zelluläre Modell für die Sarcopenie dar.

## 7. Anhang

### Materialien und Methoden

#### qPCR-Master-Mix

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5xconc.	4	1x (8mM MagI2)
Protector Rnase Inhibitor, 40 U/ µl	0,5	20 U
Deoxynucleotide Mix, 10 mM each	2	1 mM each
Transcriptor Reverse Transcriptase 20 U/ µl	0,5	10 U
= Endvolumen	7	

#### qPCR- Sondendesign

##### Serca 1

Left 5' AA<sub>g</sub>CTC<sub>g</sub>ggACATC<sub>g</sub>TT

GC- Gehalt 55,6 %

Right 5'- ggAT<sub>g</sub>TCT<sub>g</sub>CA<sub>g</sub>ggACTTT<sub>g</sub>

GC- Gehalt 55 %

	1x (µl)
Sonde #10	0,2
Primer right Atpase 1	0,2
Primer left Atpase 1	0,2
H <sub>2</sub> O	13,4
Taq	4
= MasterMix Gesamt	= 18
+ je Kapillare 2 µl cDNA	2

**Serca 2**

left 5'- gTCCTAACTgTggTgTTTTCTC

GC- Gehalt 47,8 %

Right 5'- gTTTAggAAgCggTTACTCCA

GC- Gehalt 50 %

	1x (µl)
Sonde #97	0,2
Primer right Atpase 2	0,2
Primer left Atpase 2	0,2
H <sub>2</sub> O	13,4
Taq	4
= MasterMix Gesamt	= 18
+ je Kapillare 2 µl cDNA	2

**Mitofusin 2**

Left 5'- CATTCTTgTggTCggAggAg

GC- Gehalt 55 %

Right 5'- AAggAgAgggCgATgAgTCT

GC- Gehalt 55 %

	1x (µl)
Sonde #97	0,2
Primer right Mitofusin 2	0,2
Primer left Mitofusin 2	0,2
H <sub>2</sub> O	13,4
Taq	4
= MasterMix Gesamt	= 18
+ je Kapillare 2 µl cDNA	2

**Ampk**

left 5'- CgACTACATCTgCAAACATgg

GC- Gehalt 47,6 %

Right 5'- CAgTAATCCACggCAgACA

GC- Gehalt 55 %

	1x (µl)
Sonde #11	0,2
Primer right Ampk	0,2
Primer left Ampk	0,2
H <sub>2</sub> O	13,4
Taq	4
= MasterMix Gesamt	= 18
+ je Kapillare 2 µl cDNA	2

**Sirt**

left 5'- TCgTggAgACATTTTAAATCAgg

GC- Gehalt 39,1 %

Right 5'- gCTTCATgATggCAAATgg

GC- Gehalt 52,6 %

	1x (µl)
Sonde #104	0,2
Primer right Sirt	0,2
Primer left Sirt	0,2
H <sub>2</sub> O	13,4
Taq	4
= MasterMix Gesamt	= 18
+ je Kapillare 2 µl cDNA	2

**Gapdh**

Left 5'- gggTTCCCTATAAATACggACTgC

GC- Gehalt 50 %

Right 5'- CCATTTTgTCTACgggACgA

GC- Gehalt 50 %

	1x (µl)
Sonde #52	0,2
Primer right Gapdh	0,2
Primer left Gapdh	0,2
H <sub>2</sub> O	13,4
Taq	4
= MasterMix Gesamt	= 18
+ je Kapillare 2 µl cDNA	2

**NAD2**

left 5'- CCATCAACTCAATCTCACTTCTATg

GC- Gehalt 40 %

Right 5'- ggAAggCCTCCTAgggATAg

GC- Gehalt 60 %

	1x (µl)
Sonde #67	0,2
Primer right Sirt	0,2
Primer left Sirt	0,2
H <sub>2</sub> O	13,4
Taq	4
= MasterMix Gesamt	= 18
+ je Kapillare 2 µl cDNA	2



**Galnt4**

left 5'- AAggggAggggTTTgTgAT

GC- Gehalt 52,6 %

Right 5'- TgCTCgTCTCAgAACTTTTCAC

GC- Gehalt 45,5 %

	<b>1x (µl)</b>
Sonde #67	0,2
Primer right Sirt	0,2
Primer left Sirt	0,2
H <sub>2</sub> O	13,4
Taq	4
= MasterMix Gesamt	= 18
+ je Kapillare 2 µl cDNA	2

**Light-Cycler-Protokoll**

Initialdenaturierung	95° C	600 s
<b>Zyklus:</b>		
Denaturierung	95° C	10 s
Annealing	60° C	30 s
Extension	72° C	1 s
Cooling	40° C	30 s

Reaktionsvolumen gesamt: 20 µl (= 1 Kapillare)

## Western Blot Antikörper

Primär- Ak	Verdünnung	Molekulargewicht	Sekundärantikörper
VDAC	1:1.000	31 kDa	Anti Rabbit
SDHA	1:1.000	70 kDa	Anti Mouse
Apg 7	1:500	78 kDa	Anti Sheep
ATPB	1:1.000	52 kDa	Anti Mouse
Anti- phosphor- AMPK	1:1.000	60 kDa	Anti rabbit
Mitofusin 2	1:500	75 kDa	Anti mouse
GAPDH	1:8.000	38 kDa	Anti Mouse

## Puffer und Lösungen

### modifizierte Bouin- Lösung

500 ml 10 % NBF  
 12 ml 100 % Essigsäure  
 180 ml filtrierte gesättigte Pikrinsäure  
 308 ml 1x PBS

### Citratpuffer

2,94 g Tri-sodium Citrat  
 1000 ml destilliertes Wasser  
 pH Adaptation mit Natronlauge oder Salzsäure

### Epon A

Epon 812 (Serva, Heidelberg) 62 ml  
 Epon Härter DDSA (Serva, Heidelberg) 100 ml

### Epon B

Epon 812 100 ml  
 Epon Härter MNA (Serva, Heidelberg)) 89 ml

### IPB- Puffer

50 mM Tris ph 7,4 (Merck)  
 150 mM NaCl  
 1 % Triton X-100 (Sigma Aldrich)

**10x PBS**                      80 g NaCl                      137 mM  
    2 g KCl                        2,7 mM  
    17,8 g  $\text{N}_2\text{HPO}_4$                       2 mM  
    in 1000 ml destilliertem Wasser lösen

**Running- Puffer:**    30 ml NuPage MESSDS (Invitrogen, Darmstadt)  
    570 ml Wasser

**Sörensen- Puffer**    **Puffer 1:**  
    13,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 M) in 1000 ml destilliertem Wasser lösen  
    **Puffer 2:**  
    17,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,1 M) in 1000 ml destilliertem Wasser lösen  
    160 ml Puffer 1 und 840 ml Puffer 2 mischen = 1000 ml  
    pH 7,4 mit konzentrierter HCL einstellen

**Transfer Puffer**        15 ml Transfer Puffer (Invitrogen, Carlsbad, USA)  
    30 ml Methanol (Merck)  
    255 ml destilliertes Wasser

**DEPC- Wasser**        ddH<sub>2</sub>O wurde mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat über Nacht bei RT  
    gerührt und anschließend autoklaviert

### **Färbelösungen**

#### **Toluidin- Blau Pyronin- G Färbung**

Toluidinblau:

10 g Borax (di-Natriumtetraborat- 10- hydrat (Merck)) in 1000 ml Aqua dest.

10 g Toluidinblau (Merck) dazugeben

Pyroning:

10 g Pyronin G + 1000 ml Aqua dest.

Gebrauchslösung:

4 Teile Toluidinblau

1,5 Teile Pyronin G

## Hämatoxylin- Eosin Färbung Mayers Hämalaun Fertiglösung

### Antikörper

#### 1. Primärantikörper: Verwendung an Paraffinschnitten

Mitofusin 2 (monoclonal, mouse)	Abcam, Cambridge ab56889
ATPB (monoclonal, mouse)	Abcam, Cambridge ab14730
MURF1 (monoclonal, mouse)	Abcam, Cambridge ab57865
Aconitase 2 (monoclonal, rabbit)	Abcam, Cambridge ab129069

#### 2. Primärantikörper: Verwendung für Western blots

SDHA (monoclonal, mouse)	Abcam, Cambridge ab14715
VDAC (polyclonal, rabbit)	Abcam, Cambridge ab15895
Apg 7 (polyclonal, sheep)	Abcam, Cambridge ab62112
ATPB (monoclonal, mouse)	Abcam, Cambridge ab14730
Anti- phosphor- AMPK (rabbit, polyclonal)	Millipore, Cat. # 09-290

### Sekundärantikörper

Alexa 488 Anti- mouse	Invitrogen, Darmstadt
Alexa 488 Anti-rabbit	Invitrogen, Darmstadt
Peroxidase- conjugated AffiniPure Donkey Anti- Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research, Newmarket, Suffolk, UK)	
Peroxidase- conjugated AffiniPure Donkey Anti- Rabbit (Jackson Immuno Research, Newmarket, Suffolk, UK)	

## 7. Literaturverzeichnis

**Andersson AM**, Olsen M, Zhernosekov D, Gaardsvoll H, Krog L, Linnemann D, Bock E. Age-related changes in expression of the neural cell adhesion molecule in skeletal muscle: A comparative study of newborn, adult and aged rats. *Biochem J* 1993; 290: 641-648

**Arnould D**, Grodet A, Lee YJ, Estaquier J, Backstone C. Release of OPA 1 during apoptosis participated in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem* 2005; 280: 35742-35745

**Arpa J**, Campos Y, Gutierrez-Molina M, Cruz-Martinez A, Arenas J, Caminero AB, Palomo F, Morales C, Barreiro P. Benign mitochondrial myopathy with decreased succinate cytochrome c reductase activity. *Acta Neurol Scand* 1994; 90: 281-284

**Baker DJ**, Hepple RT. Elevated caspase and AIF gene expression correlate with progression of sarcopenia during aging male F344BN rats. *Exp Gerontol* 2006; 41: 1149-1156

**Baumgartner RN**, Köhler KM, Gallagher D, Romero L, Heymsfield SB, Ross RR, Garry PJ, Lindemann RD. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 755-763

**Bentivoglio AR**, Cortelli P, Valente EM, Ialongo T, Ferraris A, Elia A, Montagna P, Albanese A. Phenotypic characterisation of autosomal recessive PARK6-linked parkinsonism in three unrelated Italian families. *Mov Disord* 2001; 16: 999-1006

**Blachly-Dyson E**, Forte M. VDAC channels. *IUBMB Life* 2001; 52: 113-118

**Bourgeois M**, Goutieres F, Chretien D, Rustin P, Munnich A, Aicardi J. Deficiency in complex II of the respiratory chain, presenting as a leukodystrophy in two sisters with Leigh syndrome. *Brain Dev* 1992; 14: 404-408

**Bourgeron T**, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, Munnich A, Rotig A. A mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature Genet* 1995; 11: 144-149

**Bradford MM**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254

**Braga M**, Sinha Hikim AP, Datta S, Ferrini MG, Brown D, Kovacheva EL, Gonzalez-Cadavid NF, Sinha- Hikim I. Involvement of oxidative stress and caspase 2- mediated intrinsic pathway signaling in age-related increase in muscle cell apoptosis in mice. *Apoptosis* 2008; 13: 822-832

**Breiter- Hahn J**, Voth M. *Microsc ResTech* 1994; 27: 198-219

**Brockmann K**, Bjornstad A, Dechent P, Korenke CG, Seitink J, Trijbels JMF, Athanassopoulos S, Villagran R, Skjeldal OH, Wilichowski E, Frahm J, Hanefeld F. Succinate in dystrophic white matter: a proton magnetic resonance spectroscopy finding characteristic for complex II deficiency. *Ann Neurol* 2002; 52: 38-46

**Brown WF**. A method for estimating the number of motor units in thenar muscles and the changes in motor unit count with ageing. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1972; 35: 845-852

**Buck M**, Chojkier M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J* 1996; 15: 1753-1765

**Campbell KP**, Kahl SD. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 1989; 16: 259-262

**Carling D**. The AMP-activated protein kinase cascade-a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 18-24

**Chabi B**, Ljubicic V, Menzies KJ, Huang JH, Saleem A, Hood DA. Mitochondrial function and apoptotic susceptibility in aging skeletal muscle. *Aging Cell* 2008; 7: 2-12

**Chan DC**. Dissecting mitochondrial fusion. *Dev Cell* 2006; 11: 592-594

**Chao JR**, Parganas E, Boyd K, Hong CY, Opferman JT, Ihle JN. Hax-1-mediated processing of HtrA2 by PARL allows survival of lymphocytes and neurons. *Nature* 2008; 452: 98-102

**Chen H**, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003; 160: 189-200

**Chen H**, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 2005; 280: 26185-26192

**Chen L**, Gong Q, Stice JP, Knowlton AA. Mitochondrial OPA1, apoptosis, and heart failure. *Cardiovasc Res* 2009; 84: 91-99

**Cipolat S**, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L, De Strooper B. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 2006; 126: 163-175

**Clark IE**, Dodson MW, Jiang C, Cao JH, Huh JR, Seol JH, Yoo SJ, Hay BA, Guo M. *Drosophila* pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* 2006; 441: 1162-1166

**Colombini M.** VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol Cell Biochem* 2004; 256-257: 107-115

**Combaret L,** Dardevet D, Béchet D, Taillandier D, Mosoni L, Attaix D. Skeletal muscle proteolysis in aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12: 37-41

**Crompton M,** Virji S, Ward JM. Cyclophilin-D binds strongly to complexes of the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide translocase to form the permeability transition pore. *Eur J Biol* 1998; 258: 729-735

**Cruz-Jentoft AJ,** Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinková E, Vandewoude M, Zamboni M. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. *Age and Aging* 2010; 39: 412-423

**Cuervo AM,** Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, French M, Terman A. Autophagy and aging: the importance of maintaining “clean” cells. *Autophagy* 2005; 1: 131-140

**Cuervo AM,** Dice JF. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 2000; 275: 31505-31513

**Daley DO,** Rapp M, Granseth E, Melén K, Drew D, von Heijine G. Global topology analysis of the Escherichia coli inner membrane proteome. *Science* 2005; 308: 1321-1323

**Davies VJ,** Hollins AJ, Piechota MJ, Yip W, Davies JR, White KE, Nicols PP, Boulton ME, Votruba M. Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Molec Genet* 2007; 16: 1307-1318

**Deas E,** Plun- Favreau H, Gandhi S, Desmond H, Kjaer S, Loh SHY, Renton AEM, Harvey RJ, Whitworth AJ, Martins LM, Abramov AY, Wood NW. PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Hum Mol Genetics* 2011; 20: 867-879

**De Brito OM,** Scorrano L. Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: the role of Ras. *Mitochondrion* 2009; 9: 222-226

**Diaz F,** Moraes CT. Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium* 2008; 44: 24-35

**Di Donato S.** Multisystem manifestations of mitochondrial disorders. *J Neurol* 2009; 256: 693–710

**DiMauro S,** De Vivo DC. Genetic heterogeneity in Leigh syndrome. *Ann Neurol* 1996; 40: 5-7

**DiMauro S**, Schon EA. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *New Eng J Med* 2003; 348: 2656-2668

**Dirks A**, Leeuwenburgh C. Apoptosis in skeletal muscle with aging. *Am J Physiol Regul Intergr Comp Physiol* 2002; 282: R519-R527

**Dirks A**, Leeuwenburgh C. Aging and lifelong calorie restriction result in adaptations of skeletal muscle apoptosis repressor, apoptosis-inducing factor, X-linked inhibitor of apoptosis, caspase-3, and caspase-12. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 27-39

**Doherty TJ**. Invited review: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol* 2003; 95: 1717-1727

**Dowse TJ**, Pascall JC, Brown KD, Soldati D. Apicomplexan rhomboids have a potential role in microneme protein cleavage during host cell invasion. *Int J Parasitol* 2005; 35: 747-756

**Dreyer HC**, Volpi E. Role of protein and amino acids in the pathophysiology and treatment of sarcopenia. *J Am Coll Nutr* 2005; 24: 140S–145S

**Engel WK**, Cunningham GG. Rapid examination of muscle tissue. An improved trichrome method for fresh-frozen biopsy sections. *Neurology* 1963; 13: 919-923

**Ernster L**, Dallner G. Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 195-204

**Essen-Gustavsson B**, Borges O. Histochemical and metabolic characteristics of human skeletal muscle in relation to age. *Acta Physiol Scand* 1986; 126: 107-114

**Esser K**, Tursun B, Ingenhoven M, Michaelis G, Pratje E. A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp 1. *J Mol Biol* 2002; 323: 835-843

**Estaquier J**, Arnoult D. Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1086-1094

**Exner N**, Treske B, Paquet D, Holmstrom K, Schiesling C, Gispert S, Carballo-Carbajal I, Berg D, Hoepken HH, Gasser T, Krüger R, Winklhofer KF, Vogel F, Reichert AS, Auburger G, Kahle PJ, Schmid B, Haass C. Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci* 2007; 27: 12413-12418

**Fernandez-Vizarra E**, Tiranti V, Zeviani M. Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 200-211



**Ferrington DA**, Krainev AG, Bigelow DJ. Altered turnover of calcium regulatory proteins of the sarcoplasmic reticulum in aged skeletal muscle. *J Biol Chem* 1998; 273: 5885-5891

**Filosto M**, Tomelleri G, Tonin P, Scarpelli M, Vattermi G, Rizzuto N, Padovani A, Simonati A. Neuropathology of mitochondrial diseases. *Biosci Rep* 2007; 27: 23-30

**Frank S**, Gaume B, Gergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 2001; 4: 515-525

**Franzini-Armstrong C**. ER-Mitochondria communication. How privileged? *Physiology* 2007; 22: 261-268

**Freeman M**. Proteolysis within the membrane: rhomboids revealed. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 188-197

**Freeman M**. Rhomboid proteases and their biological functions. *Annu Rev Genet* 2008; 42: 191–210

**Frezza C**, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 2006; 126: 177-189

**Gallio M**, Sturgill G, Rather P, Kylsten P. A conserved mechanism for extra-cellular signaling in eukaryotes and prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002a; 99: 12208-12213

**Gallio M**, Englund C, Kylsten P, Samakovlis C. Rhomboid 3 orchestrates Slit-independent repulsion of tracheal branches at the CNS midline. *Development* 2002b; 131: 3605-3614

**Gautier CA**, Kitada T, Shen J. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Nat Acad Sci* 2008; 105: 11364-11369

**Geisler S**, Holmström KM, Treis A, Skujat D, Weber SS, Fiesel FC, Kahle PJ, Springer W. The PINK1/Parkin- mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy* 2010; 6: 871-878

**George SK**, Jiao Y, Bishop CE, Lu B. Mitochondrial peptidase IMMP2L mutation causes early onset of age-associated disorders and impairs adult stem cell self-renewal. *Aging Cell* 2011; 10: 584-594

**Germain M**, Mathai JP, McBride HM, Shore GC. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1- regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO* 2005; 24: 1546-1556

**Jimenez- Roqueplo AP**, Favier J, Rustin P, Mourad JJ, Plouin PF, Corvol P, Rötig A, Jeunemaitre X. The R22X mutation of the SDHD gene hereditary paraganglioma suppresses enzymatic activity of complex 2 in mitochondrial respiratory chain and induces activation of hypoxia pathway. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1186-1197

**Gohlke U**, Pullan L, McDevitt CA, Porcelli I, de Leeuw E, Palmer T. The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10482-10486

**Goodpaster BH**, Parker SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, Schwartz AV, Simonsick EM, Tylavsky FA, Visser M, Newman AB. The loss of skeletal muscle strength, mass and quality in older adults: The health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med* 2006; 61: 1059-1064

**Greene AW**, Grenier K, Aguilera MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME, McBride HM, Park DS, Fon A. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO* 2012; 13: 378-385

**Grumati P**, Coletto L, Sabatelli P, Cescon M, Angelin A, Bertaggia E, Blaauw B, Urciuolo A, Tiepolo T, Merlini L, Maraldi NM, Bernardi P, Sandri M, Bonaldo P. Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat Med* 2010; 16: 1313-1320

**Guichard A**, Roark M, Ronshaugen M, Bier E. Brother of rhomboid, a rhomboid-released gene expressed during early drosophila oogenesis, promotes EGF-R, MAPK signaling. *Dev Biol* 2000; 226: 255-266

**Guillery O**, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombès A, Belenguer P, Arnoult D, Rojo M. Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* 2008; 100: 315-325

**Gutman M**. Modulation of mitochondrial succinate dehydrogenase activity, mechanism and function. *Mol Cell Biochem* 1978; 20: 41-60

**Ha Y**. Structure and mechanism of intramembrane protease. *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20: 240-250

**Hales KG**, Fuller MT. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 1997; 90: 121-129

**Hall ZW**, Ralston E. Nuclear domains in muscle cells. *Cell* 1989; 59: 771-772

**Hartmann D**, DeStrooper B, Saftig P. Presenilin-1 deficiency leads to loss of Cajal-Retzius neurons and cortical dysplasia similar to human type 2 lissencephaly. *Curr Biol* 1999; 9: 719-727

**Hasten DL**, Pak-Luduca J, Obert KA, Yarasheski KE. Resistance exercise acutely increases MHC and mixed muscle protein synthesis rates in 78-84 and 23-32yr olds. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: 620-626

**Haque ME**, Thomas KJ, D'Souza C, Callaghan S, Kitada T, Slack RS, Fraser P, Cookson MR, Tandon A, Park DS. Cytoplasmic Pink1 activity protects neurons from dopaminergic neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 1716-1721

**Hegde R**, Srinivasula SM, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos AS, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 2002; 277: 432-438

**Herlan M**, Vogel F, Bornhovd C, Neupert W, Reichert AS. Processing of Mgm 1 by the rhomboid-type protease Pcp 1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 2003; 278: 27781-27788

**Hill BR**, Pelligrini L. The PARL family of mitochondrial rhomboid proteases. *Semin Cell Dev Biol* 2010; 21: 582-592

**Hiona A**, Sanz A, Kujoth GC, Pamplona R, Seo AY, Hofer T, Someya S, Miyakawa T, Nakayama C, Samhan-Arias AK, Servais S, Barger JL, Portero-Otín M, Tanokura M, Prolla TA, Leeuwenburg T. Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice. *PloS ONE* 2010; 5: e11468

**Horváth R**, Abicht A, Holinski-Feder E, Laner A, Gempel K, Prokisch H, Lochmüller H, Klopstock T, Jaksch M. Leigh syndrome caused by mutations in the flavoprotein (Fp) subunit of succinated dehydrogenase (SDHA). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 74-76

**Inagaki R**, Tagawa K, Qj ML, Enokidon Y, Ito H, Tamura T, Shimizu S, Oyanagi K, Arai N, Kanazawa L, Wanker EE, Okazawa H. Omi/HtrA2 is relevant to the selective vulnerability of striatal neurons in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 2008; 28: 30-40

**Inouye SK**, Studenski S, Tinetti ME, Kuchel GAI. Geriatric syndromes: clinical, research, and policy implications of a core geriatric concept. *J Am Geriatr Soc* 2007; 55: 780-791

**Irwin WA**. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet* 2003; 35: 367-371

**Ishii N**, Fujii M, Hartmann PS, Tsuda M, Yasuda K, Senoo-Matsuda N, Yanase S, Ayusawa D, Suzuki K. A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature* 1998; 394: 694-697

**James DI**, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 2003; 278: 36373-36379

**Jaszai J**, Brand M. Cloning and expression of Ventrhold, a novel vertebrate homologue of the Drosophila EGF pathway goes rhomboid. *Mech Dev* 2002; 113: 73-77

**Ji LL**, Leeuwenburgh C, Leichtweis S, Gore M, Fiebig R, Hollander J, Bejma J. Oxidative stress and aging. Role of exercise and its influences on antioxidant systems. *Ann NY Acad Sci* 1998; 854: 102-117

**John GB**, Shang Y, Li L, Renken C, Mannella CA, Selker JM, Rangell L, Bennett MJ, Zha J. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 1543-1554

**Jones JM**, Datta P, Srinivasula SM, Ji W, Gupta S, Zhang Z, Davies E, Hajnóczy G, Saunders TL, Van Keuren ML, Fernandes-Alnemri T, Meisler MH, Alnemri ES. Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice. *Nature* 2003; 425: 721-727

**Karbowski M**, Jeong SY, Youle RJ. Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 2004; 166: 1027-1039

**Kim JY**, Hwang JM, Ko HS, Seong MW, Park BJ, Park SS. Mitochondrial DNA content is decreased in autosomal dominant optic atrophy. *Neurology* 2005; 64: 966-972

**Koonin EV**, Makarova KS, Rogozin IB, Davidovic L, Letellier MC, Pelligrini L. The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfers. *Genome Biology* 2003; 4: R19

**Kornmann B**, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS, Walter P. An ER-Mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 2009; 325: 477-481

**Kosek DJ**, Kim JS, Petrella JK, Cross JM, Bamman MM. Efficacy of 3 days/wk resistance training on myofiber hypertrophy and myogenic mechanisms in young vs. older adults. *J Appl Physiol* 2006; 101: 531-544

**Kroemer G**, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87: 99-163

**Lammens M**, Schoser B. Metabolische Myopathien – ein Überblick. *Pathologe* 2009; 30: 370–378

**Lee JR**, Urban S, Garvey CF, Freeman M. Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in Drosophila. *Cell* 2001; 107: 161-171

**Lee PA**, Tullman-Ercek D, Georgiou G. The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu Rev Microbiol* 2006; 60: 373-395

**Lees SJ**, Rathbone CR, Booth FW. Age-associated decrease in muscle precursor cell differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 290: C609-C615

**Leeuwenburgh C**, Gurley CM, Strotman BA, Dupont-Versteegden EE. Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: 1288-1296

**Leeuwenburgh C**, Prolla TA. Genetics, redox signaling, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 503-505

**Lemberg MK**, Menendez J, Misik A, Garcia M, Koth CM, Freeman M. Mechanism of intramembrane proteolysis investigated with purified rhomboid proteases. *EMBO* 2005; J 24: 464-472

**Lenaersa G**, Reynierb P, El Achouria G, Soukkarieha C, Olichonc A, Belenguerd P, Baricault L, Ducommune B, Hamela C, Delettrea C. OPA1 functions in mitochondria and dysfunctions in optic nerve. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1866–1874

**Lexell J**. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995; 50: 11-16

**Lodi R**, Tonon C, Valentino ML, Lotti S, Clementi V, Malucelli E, Barboni P, Longanesi L, Schimpf S, Wissinger B, Baruzzi A, Barbiroli B, Carelli V. Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in OPA1-related dominant optic atrophy. *Ann Neurol* 2004; 56: 719-723

**Lohi O**, Urban S, Freeman M. Diverse substrate recognition mechanisms for rhomboids; thrombomodulin is cleaved by mammalian rhomboids. *Curr Biol* 2004; 14: 236-241

**Maegawa S**, Ito K, Akiyama Y. Proteolytic action of GLpG, a rhomboid protease in the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Biochemistry* 2005; 44: 13543-13552

**Malmgren LT**, Jones CE, Bookman LM. Muscle fiber and satellite cell apoptosis in the aging human thyroarytenoid muscle: a stereological study with confocal laser scanning microscopy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 125: 34-39

**Manzur AY**, Muntoni F. Diagnosis and new treatment in muscular dystrophies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010; 80: 706-714

**Martins LM**, Morrison A, Klupsch K, Fedele V, Moiso N, Teismann P, Abuin A, Grau E, Geppert M, Livi GP, Creasy CL, Martin A, Hargreaves I, Heales SJ, Okada H, Brandner S, Schulz JB, Mak T, Downward J. Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 9848-9862

**Marzetti E**, Lawler JM, Hiona A, Manini T, Seo AY, Leeuwenburgh C. Modulation of age-induced apoptotic signaling and cellular remodeling by exercise and calorie restriction in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 2008a; 44: 160-168

**Marzetti E**, Groban L, Wohlgemuth SE, Lee HA, Lin M, Jobe H, Giovannini S, Leeuwenburgh C, Carter CS. Effects of short-term GH supplementation and treadmill

exercise training on physical performance and skeletal muscle apoptosis in old rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008b; 294: 558-567

**Marzetti E**, Carter CS, Wohlgemuth SE, Lees HA, Giovannini S, Anderson B, Quinn BS, Leeuwenburgh C. Changes in IL-15 expression and death-receptor apoptotic signaling in rat gastrocnemius muscle with aging and life-long calorie restriction. *Mech Ageing Dev* 2009; 130: 272-280

**Marzetti E**, Privitera G, Simili V, Wohlgemuth SE, Aulisa L, Pahor M, Leeuwenburgh C. Multiple pathways to the same end: Mechanisms of myonuclear apoptosis in sarcopenia of aging. *ScientificWorldJournal* 2010; 10: 340-349

**Mayr JA**, Havlickova V, Zimmermann F, Magler I, Kaplanova V, Jesina P, Pecinova A, Nuskova H, Koch J, Sperl W, Houstek J. Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit. *Hum Molec Genet* 2010; 19: 3430-3439

**McCarthy JJ**, Mula J, Miyazaki M, Erfani R, Garrison K, Farooqui AB, Srikuea R, Lawson BA, Grimes B, Keller C, Van Zants G, Campbell KS, Esser KA, Dupont-versteegden EE, Peterson CA. Effective fiber hypertrophy in satellite cell-depleted skeletal muscle. *Development* 2011; 138: 3657-3666

**McKenzie D**, Bua E, McKiernan S, Cao Z, Aiken JM, Wanagat J. Mitochondrial DNA deletion mutations: a causal role in sarcopenia. *Eur J Biochem* 2002; 269: 2010-2015

**McQuibban GA**, Saurya S, Freeman M. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 2003; 423: 537-541

**McQuibban GA**, Lee JR, Zheng L, Juusola M, Freeman M. Normal mitochondrial dynamics requires rhomboid-7 and affects *Drosophila* lifespan and neuronal function. *Curr Biol* 2006; 16: 982-989

**Mei Y**, Zhang Y, Yamamoto K, Xie W, Mak TW, You H. FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signalling in response to cytokine deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 5153-5158

**Midrio M**. The denervated muscle: facts and hypotheses. A historical review. *Eur J Appl Physiol* 2006; 98: 1-21

**Mita S**, Schmidt B, Schon EA, DiMauro S, Bonilla E. Detection of "deleted" mitochondrial genomes in cytochrom c oxidase-deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 9509-9513

**Miyata H**, Silverman HS, Sollott SJ, Lakatta EG, Stern MD, Hansford RG. Measurement of mitochondrial free Ca<sup>2+</sup> concentration in living single rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1991; 261: 1123-1134

**Montoya J**, López-Gallardo E, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ, Ruiz-Pesini E. 20 years of human mtDNA pathologic point mutations: Carefully reading the pathogenicity criteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1787: 476-483

**Morley JE**. Sarcopenia: diagnosis and treatment. *J Nutr Health Aging* 2008; 12: 452-456

**Nakagawa T**, Guichard A, Castro CP, Xiao Y, Rizen M, Zhang HZ, Hu D, Bang A, Helms J, Bier E, Derynck R. Characterization of a human rhomboid homolog, 100hRho/RHBDF1, which interacts with TGF- $\alpha$  family ligands. *Dev Dyn* 2005; 233: 1315-1331

**Narendra D**, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin- induced mitophagy in the pathogenesis of Parkinson disease. *Autophagy* 2009; 5: 706-708

**Narendra DP**, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 2010; 8: e1000298

**Neuen-Jacob E**. Muskeldystrophien. *Pathologe* 2009; 30: 357-364

**Okamoto K**, Shaw JM. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 2005; 39: 503-536

**Olichon A**, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G. Loss of OPA 1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrom c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 7743-7746

**Parfait B**, Chretien D, Rötig A, Marsac C, Munnich A, Rustin P. Compound heterozygous mutations in the flavoprotein gene of the respiratory chain complex II in a patient with Leigh syndrome. *Hum Genet* 2000; 106: 236-243

**Park SY**, Kim HY, Lee JH, Yoon KH, Chang MS, Park SK. The age-dependent induction of apoptosis-inducing factor (AIF) in the human semitendinosus skeletal muscle. *Cell Mol Biol Lett* 2010; 15: 1-12

**Parone PA**, James DI, Da Cruz S, Mattenberger Y, Donzé O, Barja F, Martinou JC. Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 7397-7408

**Pascall JC**, Luck JE, Brown KD. Expression in mammalian cell cultures reveals interdependent, but distinct, functions for Star and Rhomboid proteins in the processing of the Drosophila transforming-growth-factor- $\alpha$  homologue Spitz. *Biochem J* 2002; 363: 347-352

**Pascall JC**, Brown KD. Intramembrane cleavage of ephrin B3 by the human rhomboid family protease, RHBDL 2. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 244-252

**Pellegrini L**, Passer BJ, Canelles M, Lefterov I, Ganjei JK, Fowlkes BJ, Koonin EV, D'Adamio L. PAMP and PARL, two novel putative metalloproteases interacting with the COOH-terminus of Presenilin-1 and -2. *J Alzheimers Dis* 2001; 3: 181–190

**Petit A**, Kawarai T, Paitel E, Sanjo N, Maj M, Scheid M, Chen F, Gu Y, Hasegawa H, Salehi-Rad S, Wang L, Rogaeva E, Fraser P, Robinson B, St George-Hyslop P, Tandon A. Wild-type PINK1 prevents basal and induced neuronal apoptosis, a protective effect abrogated by Parkinson disease-related mutations. *J Biol Chem* 2005; 280: 34025-34032

**Perkins G**, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T. Electron tomography of neuronal mitochondria: Three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol* 1997; 119: 260-272

**Petersen KF**, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science* 2003; 300: 1140-1142

**Phillips T**, Leeuwenburgh C. Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long calorie restriction. *Faseb J* 2005; 19: 668-670

**Pistilli EE**, Jackson JR, Alway SE. Death receptor-associated pro-apoptotic signaling in aged skeletal muscle. *Apoptosis* 2006a; 11: 2115-2126

**Pistilli EE**, Siu PM, Alway SE. Molecular regulation of apoptosis in fast plantaris muscles of aged rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006b; 61: 245-255

**Pizzo P**, Pozzan T. Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 511-517

**Plun-Favreau H**, Klupsch K, Molsol N, Gandhi S, Kjaer S, Frith D, Harvey K, Deas E, Harvey RJ, McDonald N, Wood NW, Martins LM, Downward J. The mitochondrial protease HtrA2 is regulated by Parkinson's disease-associated kinase Pink1. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1243-1252

**Poole AC**, Thomas RE, Andrews LA, McBride HM, Whitworth AJ, Pallanck LJ. The Pink1/Parkin pathway regulates mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 1638-1643

**Rajah R**, Lee KW, Cohen P. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis: role of Bcl-2 phosphorylation. *Cell Growth Differ* 2002; 13: 163-171

**Rather PN**, Ding X, DeLancey BRR, Siddiqui S. Providencia stuartii genes activated by cell-to-cell signaling and identification of a gene required for production or activity of an extracellular factor. *J Bacteriol* 1999; 181: 7185-7191



**Reed UC**, Ferreira LG, Liu EC, Resende MBD, Carvalho MS, Marie SK, Scaff M. Ulrich congenital muscular dystrophy and Bethlem myopathy. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63: 785-790

**Rice KM**, Blough ER. Sarcopenia-related apoptosis is regulated differently in fast- and slow-twitch muscles of the aging F344/N x BN rat model. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 670-679

**Riggs JE**, Schochet SS, Fakadej AV, Papadimitriou A, DiMauro S, Crosby TW, Gutman L, Moxley RT. Mitochondrial encephalomyopathy with decreased succinate-cytochrome-c-reductase activity. *Neurology* 1984; 34: 48-53

**Rivner MD**, Shamsnia M, Swift TR, Trefz J, Roesel RA, Carter AL, Yanamura W, Hommes FA. Kearns-Sayre syndrome and complex II deficiency. *Neurology* 1989; 39: 693-696

**Rizzuto R**, Simpson AW, Brini M, Pozzan T. Rapid changes of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  revealed by specifically targeted recombinant aequorin. *Nature* 1992; 358: 325-327

**Rizzuto R**, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  responses. *Science* 1998; 280: 1763-1766

**Kuma V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. Robbins** Basis Pathology. Philadelphia: Saunders Company, 2010

**Romanello V**, Guadagnin E, Gomes L, Roder I, Sandri C, Petersen Y, Milan G, Masiero E, Del Piccolo P, Foretz M, Scorrano L, Rudolf R, Sandri M. Mitochondrial fission and remodelling contributes to muscle atrophy. *EMBO J* 2010; 29: 1774-1785

**Roos MR**, Rice CL, Vandervoort AA. Age-related changes in motor unit function. *Muscle Nerve* 1997; 20: 679-690

**Rooyackers OE**, Adey DB, Ades PA, Nair KS. Effect of age on in vivo rates of mitochondrial protein synthesis in human skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 15364-15369

**Rosenberg IH**. Summary comments: epidemiological and methodological problems in determining nutritional status of older persons. *Am J Clin Nutr* 1989; 50: 1231-1233

**Rosenberg IH**. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr* 1997; 127: 990S-991S

**Rostovtseva TK**, Komarov A, Bezrukov SM, Colombini M. VDAC channels differentiate between natural metabolites and synthetic molecules. *J Membr Biol* 2002; 187: 147-156

**Rustin P**, Munnich A, Rotig A. Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 289-291

**Safdar A**, Hamadeh MJ, Kaczor JJ, Raha S, Debeer J, Tarnopolsky MA. Aberrant mitochondrial homeostasis in the skeletal muscle of sedentary older adults. *PLoS One* 2010; 24: 5: e10778

**Saini A**, Al- Shanti N, Faulkner SH, Stewart CE. Pro- and anti-apoptotic roles for IGF-1 in TNF- $\alpha$ -induced apoptosis: a MAP kinase mediated mechanism. *Growth Factors* 2008; 26: 239-253

**Sandri M**. Autophagy in health and disease. 3. Involvement of autophagy in muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298:C1291-1297

**Santel A**, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 2001; 114: 867-874

**Schäfer A**, Reichert AS. Emerging roles of mitochondrial membrane dynamics in health and disease. *Biol Chem* 2009; 390: 707–715

**Schleicher M**, Shepherd BR, Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Yu J, Pan Y, Acevedo LM, Shadel GS, Sessa WC. Prohibitin-1 maintains the angiogenic capacity of endothelial cells by regulating mitochondrial function and senescence. *J Cell Biol* 2008; 180: 101-112

**Schulz C**, Wood CG, Jones DL, Tazuke SL, Fuller MT. Signaling from germ cells mediated by the rhomboid homolog stc organizes encapsulation by somatic support cells. *Development* 2002; 129: 4523-4535

**Seo AY**, Xu J, Servais S, Hofer T, Marzetti E, Wohlgemuth SE, Knutson MD, Chung HY, Leeuwenburgh C. Mitochondrial iron accumulation with age and functional consequences. *Aging Cell* 2008; 7: 706-716

**Sheridan C**, Martin SJ. Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* 2010; 10: 640-648

**Shoshan-Barmatz V**, Israelson A, Brdiczka D, Sheu SS. The voltage-dependent anion channel (VDAC): function in intracellular signalling, cell life and cell death. *Curr Pharm Des* 2006; 18: 2249-2270

**Simoneau J-A**, Kelley DE. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol* 1997; 83: 166-171

**Siu PM**, Always SE. Aging alters the reduction of pro-apoptotic signaling in response to loading-induced hypertrophy. *Exp Gerontol* 2006; 41: 175-188

**Smirnova E**, Griparic L, Shurland DL, van der Vliet AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 2245-2256

**Sperl W**, Jesina P, Zeman J, Mayr JA, DeMeirleir L, VanCoster R, Pickova A, Hansikova H, Houstkova H, Krejcik Z, Koch J, Smet J, Muss W, Holme E, Houstek J. Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin. *Neuromusc Disord* 2006; 16: 821-829

**Stevenson LG**, Strisovsky K, Clemmer KM, Bhatt S, Freeman M, Rather PN. Rhomboid protease AarA mediates quorum-sensing in *Providencia stuartii* by activating TatA of the twin-arginine translocase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 1003-1008

**Strasser H**, Tiefenthaler M, Steinlechner M, Bartsch G, Konwalinka G. Urinary incontinence in the elderly and age-dependent apoptosis of rhabdosphincter cells. *Lancet* 1999; 354: 918-919

**Strauss KM**, Martins LM, Plun-Favreau H, Marx FP, Kautzmann S, Berg D, Gasser T, Wszolek Z, Muller T, Bornemann A, Wolburg H, Downward J, Riess O, Schulz JB, Kruger R. Loss of function mutations in the gene encoding Omi/HtrA2 in Parkinson's disease. *Hum Molec Genet* 2005; 14: 2099-2111

**Szulc P**, Duboeuf F, Marchand F, Delmas PD. Hormonal and lifestyle determinates of appendicular skeletal muscle mass in men: the MINOS study. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 496-503

**Tamilselvan J**, Jayaraman G, Sivarajan K, Panneerselvam C. Age-dependent upregulation of p53 and cytochrom c release and susceptibility to apoptosis in skeletal muscle fiber of aged rats: role of carnitine and lipoic acid. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 1656-1669

**Tang S**, Le PK, Tse S, Wallace DC, Huang T. Heterozygous mutation of OPA1 in *Drosophila* shortens lifespan mediated through increase reactive oxygen species production. *PLOS One* 2009; 4: e4492

**Tsruya R**, Schlesinger A, Reich A, Gabay L, Sapir A, Shilo BZ. Intracellular trafficking by Star regulates cleavage of the *Drosophila* EGF receptor ligand Spitz. *Genes Dev* 2002; 16: 222-234

**Urban S**, Lee JR, Freeman M. *Drosophila* rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell* 2001; 107: 173-182

**Urban S**, Schlieper D, Freeman M. Conservation of intramembrane proteolytic activity and substrate specificity in prokaryotic and eukaryotic rhomboids. *Curr Biol* 2002a; 12: 1507-1512

**Urban S**, Freeman M. Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution. *Curr Opin Genet Dev* 2002b; 12: 512-518

**Urban S**, Freeman M. Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Mol Cell* 2003; 11: 1425-1434

**Urban S**, Brown G, Freeman M. EGF receptor signaling protects smooth-cuticle cells from apoptosis during *Drosophila* ventral epidermis development. *Development* 2004; 131: 1835-1845

**Urban S**. Rhomboid proteins: conserved membrane proteases with divergent biological functions. *Genes Dev* 2006; 20: 3054–3068

**Valente EM**, Salvi S, Ialongo T, Marongiu R, Elia AE, Caputo V, Romito L, Albanese A, Dallapiccola B, Bentivoglio AR. PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism. *Ann Neurol* 2004; 56: 336-341

**Vance JE**, Stone SJ, Faust JR. Abnormalities in mitochondria-associated membranes and phospholipid biosynthetic enzymes in the *mnd/mnd* mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1344: 286-299

**Vergunst CE**, van der Sande MG, Lebre MC, Tak PP. The role of chemokines in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 2005; 34: 415-425

**Verhagen AM**, Silke J, Ekert PG, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly LM, Day CL, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 2002; 277: 445-454

**Vinothkumar KR**. Structure of rhomboid protease in a lipid environment. *J Mol Biol* 2011; 407: 232-247

**Visser M**, Pahor M, Taaffe DR, Goodpaster BH, Simonsick EM, Newman AB, Nevitt M, Harris TB. Relationship of Interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  with muscle mass and strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J Gerontol A Biol Sci Med* 2002; 57: 326-332

**Walder K**, Kerr-Bayles L, Civitarese A, Jowett J, Curran J, Elliot K, Trevaskis J, Bishara N, Zimmet P, Mandarino L, Ravussin E, Blangero J, Kissebah A, Collier GR. The mitochondrial rhomboid protease PSARL is a new candidate gene for type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004; 48: 459-468

**Walle LV**, Lamkanfi M, Vandenabeele P. The mitochondrial serine protease HtrA2/Omi: an overview. *Cell Death Differ.* 2008; 15: 453-460

**Wanagat J**, Cao A, Pranali P, Aiken JM. Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *Faseb J* 2001; 15: 322-332

**Wang Y**, Maegawa S, Akiyama Y, Ha Y. The role of the L1 loop in the mechanism of rhomboid intramembrane protease GlpG. *J Mol Biol* 2007; 374: 1104-1113

**Wassermann JD**, Freeman M. Control of EGF receptor activation in *Drosophila*. *Trends Cell Biol* 1997; 7: 431-436

**Wassermann JD**, Urban S, Freeman M. A family of rhomboid-like genes: *Drosophila* rhomboid-1 and roughoid/rhomboid-3 cooperate to activate EGF receptor signaling. *Genes Dev* 2000; 14: 1651-1663

**Waters CM**, Bassler BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 319-346

**Welle S**, Bhatt K, Shah B, Needler N, Delehanty JM, Thornton CA. Reduced amount of mitochondrial DNA in aged human muscle. *J Appl Physiol* 2003; 94: 1479-1484

**Wei MC**, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001; 292: 727-730

**Whitman SA**, Wacker MJ, Richmond SR, Godard MP. Contributions of the ubiquitin-proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age. *Pflugers Arch* 2005; 450: 437-446

**Whitworth AJ**, Lee JR, Ho VM, Flick R, Chowdhury R, McQuibban GA. Rhomboid-7 and HtrA2/Omi act in a common pathway with the Parkinson's disease factors Pink1 and Parkin. *Dis Model Mech* 2008; 1:168-174

**Yamaguchi R**, Lartigue L, Perkins G, Scott RT, Dixit A, Kushnareva Y, Kuwana T, Ellisman MH, Newmeyer DD. OPA1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Mol Cell* 2008; 31: 557-569

**Yang Y**, Gehrke S, Inai Y, Huang Z, Ouyang Y, Wang JW, Yang L, Beal MF, Vogel H, Lu B. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* Pink1 is rescued by parkin. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103: 10793-10798

**Yang Y**, Ouyang Y, Yang L, Beal MF, McQuibban A, Vogel H, Lu B. Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 7070-7075

**Ye J**, Davé UP, Grishin NV, Goldstein JL, Brown MS. Asparagine-proline sequence within membrane-spanning segment of SREBP triggers intramembrane cleavage by site-2 protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 5123-5128

**Yu-Wai-Man P**, Sitarz KS, Samuels DC, Griffiths PG, Reeve AK, Bindoff LA, Horvath R, Chinnery PF. OPA1 mutations cause cytochrome c oxidase deficiency due to loss of wild-type mtDNA molecules. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 3043-3052

**Zanna C**, Ghelli A, Porcelli AM, Karbowski M, Youle RJ, Schimpf S, Wissinger B, Pinti M, Cossarizza A, Vidoni S, Valentino ML, Rugolo M, Carelli V. OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 2008; 131: 352-353